

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno – matematički fakultet  
Biološki odsjek

Elizabeta Banić

Promjene u ultrastrukturi, proteomu i fotosintetskoj  
učinkovitosti klijanaca duhana (*Nicotiana tabacum* L.)  
pod utjecajem nanočestica i iona srebra

Diplomski rad

Zagreb, 2017.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za elektronsku mikroskopiju i Laboratoriju za biljnu proteomiku Zavoda za molekularnu biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom doc. dr. sc. Petre Peharec Štefanić, u Laboratoriju za fiziologiju bilja Botaničkog zavoda Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu uz stručnu pomoć izv. prof. dr. sc. Mirte Tkalec te u laboratoriju Centra za proteomiku i spektrometriju masa Instituta Ruđer Bošković uz stručnu pomoć doc. dr. sc. Maria Cindrića. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

*Zahvaljujem svojoj mentorici, doc. dr. sc. Petri Peharec Štefanić, na svem znanju, trudu, savjetima, pomoći i strpljenju iskazanom tijekom stručne prakse, izrade i pisanja diplomskog rada.*

*Zahvaljujem doc. dr. sc. Mariu Cindriću na pomoći oko analize proteina spektrometrijom masa, a izv. prof. dr. sc. Mirti Tkalec zahvaljujem na pomoći oko mjerenja i analize fluorescencije klorofila.*

*Zahvaljujem svemu osoblju Laboratorija za biljnu proteomiku i Centra za proteomiku i spektrometriju masa zbog poticajne radne atmosfere i pomoći pružene čak i kad se ne očekuje.*

*Zahvaljujem svim kolegicama i kolegama koji su mi pružili podršku tijekom izrade i pisanja diplomskog rada i uljepšali mi studentske dane svojim optimizmom.*

*Posebno zahvaljujem svojoj obitelji, koja me uvijek potiče da pokušam više.*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

### PROMJENE U ULTRASTRUKTURI, PROTEOMU I FOTOSINTETSKOJ UČINKOVITOSTI KLIJANACA DUHANA (*Nicotiana tabacum* L.) POD UTJECAJEM NANOČESTICA I IONA SREBRA

Elizabeta Banić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Nanočestice srebra (AgNP) se zbog antimikrobnih svojstava koriste u širokom spektru nanotehnoških proizvoda, koji se, između ostaloga, koriste u medicini, prehrambenoj tehnologiji i poljoprivredi. Toksičnost AgNP dokazana je na brojnim organizmima, a ovisi o veličini, obliku i površinskom naboju nanočestica, tipu molekula-omotača i otpuštanju iona srebra. Duhan (*Nicotiana tabacum* L.) je ekonomski važna kultura i u molekularnoj biologiji uvriježen modelni organizam. U ovom diplomskom radu istražila sam utjecaj AgNP istog oblika, veličine i koncentracije, a stabiliziranih različitim omotačima (bPEI, citrat ili PEG), na klijance duhana. Sjemenke duhana isključivala sam u tekućem mediju s dodatkom različitih AgNP ili srebrovog nitrata u koncentraciji 100  $\mu$ M, a u slučaju kontrole bez dodatka srebra. Klijance sam koristila za istraživanje desetog dana tretmana. Tretmani su inhibirali rast korijena, narušili strukturu meristema korijena i uzrokovali promjene u ultrastrukturi kloroplasta. Sadržaj fotosintetskih pigmenata i parametri fluorescencije klorofila također su bili promijenjeni. Proteom klijanaca duhana pokazao je povećanu ekspresiju proteina prvenstveno vezanih uz fotosintezu i odgovor na stres. Nekoliko proteina pokazalo je različit odgovor na nanočestice i ione srebra. AgNP različitih omotača utjecale su na klijance duhana na različit način, no pokazale su se toksičnijima od iona srebra iste koncentracije.

(68 stranica, 13 slika, 17 tablica, 85 literaturnih navoda, 2 priloga, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: transmisijaska elektronska mikroskopija, 2-D elektroforeza, spektrometrija masa, fluorescencija klorofila, fotosintetski pigmenti, nanotoksikologija

Voditelj: Dr. sc. Petra Peharec Štefanić, doc.

Ocjenitelji: Dr. sc. Petra Peharec Štefanić, doc.

Dr. sc. Mirta Tkalec, izv. prof.

Dr. sc. Martina Šeruga Musić, izv. prof.

Rad prihvaćen: 8. lipnja 2017.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Division of Biology

Graduation thesis

### CHANGES IN ULTRASTRUCTURE, PROTEOME AND PHOTOSYNTHETIC EFFICIENCY OF TOBACCO SEEDLINGS (*Nicotiana tabacum* L.) EXPOSED TO SILVER NANOPARTICLES AND IONS

Elizabeta Banić

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Silver nanoparticles (AgNPs) are used for their antimicrobial properties in a wide variety of nanotechnology products used in many fields, including medicine, food technology, and agriculture. The toxicity of AgNPs was proven on many organisms and depends on their size, shape, surface charge, type of coating and release of silver ions. Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) is an important cash crop and an established model organism in molecular biology. In this thesis, I investigated the influence of AgNPs of the same shape, size, and concentration and stabilised with different coatings (bPEI, citrate or PEG) on tobacco seedlings. Tobacco seeds were germinated in liquid medium containing different AgNPs or silver nitrate in 100  $\mu$ M concentration. In the case of control, no silver was added. The seedlings were used for research on the tenth day of the treatment. The treatments inhibited root growth, disrupted root meristem structure and caused changes in chloroplast ultrastructure. Photosynthetic pigments' content and chlorophyll fluorescence parameters also changed. Tobacco seedling proteome showed an increased expression of proteins, primarily related to photosynthesis and stress response. A few proteins differed in response to AgNP and silver ion treatment. Differently coated AgNPs affected tobacco seedlings in a different manner and showed to be more toxic than silver ions of equal concentration.

(68 pages, 13 figures, 17 tables, 85 references, 2 supplements, original in: Croatian)

Thesis deposited in Central Biological Library.

Key words: transmission electron microscopy, 2-D electrophoresis, mass spectrometry, chlorophyll fluorescence, photosynthetic pigments, nanotoxicology

Supervisor: Dr. sc. Petra Peharec Štefanić, Asst. Prof.

Reviewers: Dr. sc. Petra Peharec Štefanić, Asst. Prof.

Dr. sc. Mirta Tkalec, Assoc. Prof.

Dr. sc. Martina Šeruga Musić, Assoc. Prof.

Thesis accepted: 8 June 2017

## Sadržaj

<b>1. Uvod</b>	<b>1</b>
1.1. Nanotehnologija i nanomaterijali	1
1.2. Nanočestice srebra	1
1.3. Duhan	2
1.4. Svjetlosna i elektronska mikroskopija	3
1.5. Proteomika	3
1.6. Fluorescencija klorofila	6
<b>2. Cilj istraživanja</b>	<b>10</b>
<b>3. Materijali i metode</b>	<b>11</b>
3.1. Materijali	11
3.1.1. Nanočestice srebra	11
3.1.2. Biljni materijal	11
3.2. Metode	14
3.2.1. Morfometrija i mikroskopija	15
3.2.1.1. Morfometrija korijena klijanaca duhana	15
3.2.1.2. Svjetlosna i elektronska mikroskopija	15
3.2.2. Proteomika	16
3.2.2.1. Ekstrakcija ukupnih proteina	16
3.2.2.2. Određivanje koncentracije proteina	18
3.2.2.3. Razdvajanje proteina dvodimenzionalnom elektroforezom u denaturirajućim uvjetima	20
3.2.2.3.1. Rehidracija imobilina	20
3.2.2.3.2. Prva dimenzija – izoelektrično fokusiranje	20
3.2.2.3.3. Ekvilibracija imobilina	21
3.2.2.3.4. Druga dimenzija – SDS-PAGE	21
3.2.2.3.5. Vizualizacija proteinskih mrlja	23
3.2.2.4. Skeniranje gelova i usporedba ekspresijskih profila	23
3.2.2.5. Spektrometrija masa	24
3.2.2.5.1. Priprema uzoraka za digestiju u gelu	24

3.2.2.5.2. Digestija uzoraka u gelu pomoću tripsina	25
3.2.2.5.3. Ekstrakcija peptida iz gela	25
3.2.2.5.4. Pročišćavanje peptida	25
3.2.2.5.5. Analiza peptida spektrometrom masa	27
3.2.2.5.6. Identifikacija proteina pretraživanjem baza podataka NCBIInr i UniProt	27
3.2.3. Fotosinteza	28
3.2.3.1. Određivanje koncentracije fotosintetskih pigmenata	28
3.2.3.2. Mjerenje fluorescencije klorofila	28
<b>4. Rezultati</b>	<b>31</b>
4.1. Vizualizacija nanočestica srebra	31
4.2. Morfometrija korijena klijanaca duhana	31
4.3. Mikroskopija	32
4.4. Proteomika	38
4.5. Sadržaj fotosintetskih pigmenata	45
4.6. Fluorescencija klorofila	46
<b>5. Rasprava</b>	<b>48</b>
5.1. Promjene u morfologiji i ultrastrukturi	48
5.2. Promjene u proteomu	50
5.2.1. Proteini vezani uz fotosintezu	51
5.2.2. Proteini vezani uz odgovor na stres	51
5.2.3. Ostali proteini	54
5.3. Promjene u sadržaju fotosintetskih pigmenata	56
5.4. Promjene u parametrima fluorescencije klorofila	56
<b>6. Zaključak</b>	<b>59</b>
<b>7. Literatura</b>	<b>60</b>
Prilog 1	I
Prilog 2	IV
Životopis	VII

## Popis kratica i oznaka

½ MS	Hranidbeni medij Murashige-Skoog s polovičnom koncentracijom makroelemenata
2-DE	Dvodimenzionalna elektroforeza u poliakrilamidnom gelu
AA	Akrlamid
AgNP	Nanočestice srebra
aH <sub>2</sub> O	Autoklavirana destilirana voda
APS	Amonijev peroksodisulfat
APX	Askorbat peroksidaza
ATP	Adenozin trifosfat
Bis	N,N'-metilen-bis-akrilamid
bPEI	Razgranati polietilenimin
BSA	Goveđi serumski albumin
C <sub>a</sub>	Koncentracija klorofila <i>a</i>
CAT	Katalaza
C <sub>b</sub>	Koncentracija klorofila <i>b</i>
CBB	Coomassie brilliant blue
CHAPS	3-[(3-kolamidopropil)dimetilamonijev]-2-hidroksi-1-propansulfonat
CHCA	α-cijano-4-hidroksi-cimetna kiselina
C <sub>x+c</sub>	Koncentracija ukupnih karotenoida
deH <sub>2</sub> O	Destilirana voda
DTT	Ditiotreitol
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina
GDC	Glicin dekarboksilaza
IAA	Jodoacetamid
IEF	Izoelektrično fokusiranje
LHCII	Kompleks antena vezan uz fotosustav II
MALDI	Matricom potpomognuta ionizacija uz desorpciju laserskim zračenjem
MS	Spektrometrija masa
MS /MS	Tandemska spektrometrija masa
NADPH	Nikotinamid adenin dinukleotid fosfat



NPQ	Nefotokemijsko gašenje fluorescencije klorofila
PAGE	Elektroforeza u poliakrilamidnom gelu
PEG	Polietilen-glikol
PMSF	Fenilmetilsulfonil fluorid
PSII	Fotosustav II
PVP	Polivinilpirolidon
qP	Fotokemijsko gašenje fluorescencije klorofila
QY	Kvantni prinos fotosustava II
reH <sub>2</sub> O	Redestilirana voda (miliQ voda)
ROS	Reaktivni oblici kisika
Rubisco	Ribuloza-1,5-bisfosfat-karboksilaza/oksigenaza
SDS	Natrijev dodecil sulfat
SOD	Superoksid dismutaza
TEM	Transmisijska elektronska mikroskopija
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamin
TFA	Trifluoroctena kiselina
TOF	Vrijeme leta
Tris	2-amino-2-hidroksimetil-propan-1,3-diol
UV/VIS	Ultraljubičasto zračenje / vidljiva svjetlost

## 1. Uvod

### 1.1. Nanotehnologija i nanomaterijali

Materijali koji imaju proporcije 1-100 nm barem u jednoj dimenziji nazivaju se nanomaterijalima, a interdisciplinarno područje koje se njima bavi naziva se nanotehnologijom. Nanomaterijali zbog većeg omjera površine i volumena imaju veću reaktivnost, što im pruža drugačija svojstva u odnosu na istovrsne materijale drugih dimenzija (Wijnhoven i sur. 2009). Do travnja 2017. u bazi podataka nanotehnoloških proizvoda (*Nanotechnology Product Database*, NPD) zabilježena su 7457 proizvoda koje proizvodi 1169 proizvođača iz 52 države <<http://product.statnano.com>>. Prema statističkom izvješću StatNano za 2016. godinu, broj objavljenih znanstvenih članaka u području nanotehnologije od 2006. godine je u stalnom porastu, kao i njihov udio među ukupnim objavljenim člancima. Izvješće također navodi nanočestice srebra kao vodeći nanomaterijal po broju proizvoda, vrsti materijala i poduzeća koja ih proizvode. Slijede ih nanočestice od titanijevog dioksida, silicijevog dioksida, tungstenovog dioksida i grafitu. Nanomaterijali se koriste u elektronici, medicini, građevini, kozmetici, automobilske industriji, pročišćavanju otpadnih voda i remedijaciji, tekstilnoj industriji, energetici, sportu, hrani, poljoprivredi, naftnoj industriji i kućanskim uređajima.

### 1.2. Nanočestice srebra

Nanočestice srebra (AgNP) koriste se većinom zbog svojih antimikrobnih i antivirusnih svojstava. Antimikrobna svojstva srebrovih iona i koloidnih otopina već su dugo poznata. AgNP sa svoje površine otpuštaju ione srebra te osiguravaju dugotrajnu antimikrobnu zaštitu kirurškog pribora, implantata, zaštitne i sportske odjeće i obuće, tipkovnica, mobitela, kuhinjskog pribora i raznih kućanskih aparata. Koriste se u elektronici i senzorima, oblogama za rane, kozmetici, sredstvima za čišćenje, filtrima za pročišćavanje, pakiranju hrane te u dodacima hrani i hrani za životinje (Wijnhoven i sur. 2009, Sekhon i sur. 2014). AgNP uobičajene su i u agronomiji, ponajprije kao zamjena za pesticide (Madhuri i sur. 2010).

Svojstvo koje AgNP čini poželjnima za upotrebu zapravo je i znak za uzbunu. Osim što su toksične za bakterije (Sondi i Salopek-Sondi 2004, Choi i sur. 2008), AgNP toksične su i za alge (Matorin i sur 2013), vodene i kopnene biljke (Jiang i sur. 2012, Nair i sur. 2015, Yin i sur. 2011) te životinje i kulture ljudskih stanica (Ahamed i sur. 2010, Johnston i sur. 2010) pa se postavlja pitanje i o riziku upotrebe za ljude. Iz mnogih komercijalno dostupnih proizvoda AgNP mogu izravno ili neizravno dospjeti u okoliš, gdje mogu narušiti ekosustave tla (Sillen i

sur. 2015, Zhai i sur. 2016), no čini se da nemaju velik utjecaj na vodene ekosustave (Blakelock i sur. 2016). Za toksičnost nanočestica važni su veličina i oblik te vrsta i naboj molekula-omotača (Silva i sur. 2014, Tejamaya i sur. 2012). Budući da AgNP otpuštaju ione srebra (Beer i sur. 2011, Yin i sur. 2011), teško je zaključiti proizlazi li toksičnost AgNP iz svojstava same nanočestice ili iona koje otpušta.

Utjecaj AgNP na kopnene biljke slabije je istražen od njihovog utjecaja na mikroorganizme i životinje. Istraživanja vezana uz AgNP i biljke često se odnose na korištenje biljaka i biljnih ekstrakata za ekološki prihvatljivu, „zelenu“ sintezu AgNP (El-Nour 2010., Mashwani i sur. 2015, Chung i sur. 2016). Poznato je da biljke mogu primiti nanočestice iz okoliša te ih translocirati i akumulirati u korijenu ili listovima (pregled u Schwab i sur. 2015). Propusnost biljke za nanočestice ovisi o veličini i obliku čestica te o vrsti biljke i propustnosti staničnih stijenki (Tripathi i sur. 2017). Akumulacija AgNP primijećena je u vrsta *Phaseolus radiatus* i *Sorghum bicolor* (Lee i sur. 2012). Geisler-Lee i sur. (2013 i 2014) pokazali su da se AgNP nakupljaju u korijenovom vršku uročnjaka (*Arabidopsis thaliana*) i to ovisno o veličini, a kasnije i da se AgNP u uročnjak primaju pomoću korijenovih dlačica, transportiraju kroz floem i ksilem te akumuliraju u kotiledonima i listovima. AgNP mogu narušiti morfologiju i brzinu rasta korijena i izdanka, strukturu staničnih stijenki i funkciju membrana. Zbog povećane produkcije reaktivnih oblika kisika uzrokuju oksidacijski stres, što može promijeniti ekspresiju gena i uzrokovati oštećenja DNA (Monica i Cremonini 2009, Tripathi i sur. 2017).

### 1.3. Duhan

Duhan (*Nicotiana tabacum* L.) je jednogodišnja zeljasta biljka iz porodice pomoćnica (Solanaceae), porijeklom iz tropske Amerike. Može doseći visinu 1-2 m, a ovalni ili lanceolatni listovi mogu narasti do dužine 60-100 cm. Boja cvjetova je u rasponu od bijele, preko ružičaste, do crvene, cjevastog su oblika i dosežu veličinu do 5 cm. Ovalni plodovi sadrže brojne smeđe okrugle sjemenke, promjera oko 0,5 mm <<http://www.eol.org/pages/581050/overview>>. Ova vrsta je prirodni amfidiploid, što znači da je nastala hibridizacijom dviju roditeljskih vrsta i pritom zadržala diploidne setove kromosoma obaju roditelja (Ren i Timco, 2001). Duhan je kultiviran i uzgajan za ritualne i medicinske svrhe među domorodačkim narodima diljem Sjeverne i Južne Amerike. Nakon otkrića Amerike uzgoj duhana proširio se u Europu i ostatak svijeta. Korišten je kao otrov i insekticid, ali i ljekovita biljka, a žvakanje njegovih listova i udisanje dima u rekreacijske svrhe uvriježili su se u mnogim kulturama diljem svijeta. Duhan sadrži brojne sekundarne metabolite, a među njima je najpoznatiji nikotin, koji izaziva ovisnost.

Brojni spojevi sadržani u duhanskom dimu dokazano su kancerogeni i uzrokuju rak pluća (Hecht 1999). Usprkos štetnosti, uživanje duhanskih proizvoda još uvijek je popularno te uzgoj duhana i prateća industrija imaju iznimno velik ekonomski značaj. Tijekom proteklih desetljeća, duhan je pronašao i svoju ulogu kao modelni organizam, uglavnom u područjima funkcionalne genomike i biotehnologije, te mu je i genom sekvenciran (Sierro i sur. 2014).

#### 1.4. Svjetlosna i elektronska mikroskopija

Analiza toksičnosti nanočestica gotovo je nezamisliva bez mikroskopije. Svjetlosna mikroskopija omogućava uvid u strukturu dijelova biljke na razini tkiva i stanica te je moguće utvrditi promjene u morfologiji uzrokovane djelovanjem AgNP ili iona srebra te njihovu eventualnu akumulaciju (Yin i sur. 2011). Karakteristično za AgNP i ione srebra je da, kao posljedica akumulacije, korijenov vršak posmeđi (Geisler-Lee 2013). Pomoću transmisijske elektronske mikroskopije (TEM) moguće je detektirati promjene u morfologiji na razini staničnih organela, ali i locirati AgNP u biljnom tkivu. AgNP su dovoljno velike da se pomoću TEM-a može promatrati njihov oblik i položaj u ultrastrukturama biljke te donositi zaključke o njihovoj lokalizaciji i akumulaciji. Pritom treba biti oprezan jer metode pripreme uzoraka za TEM mogu uzrokovati artefakte velike elektronske gustoće, koje je teško razlikovati od nanočestica metala. Prisutnost atoma određenog elementa može se utvrditi pomoću analitičkog elektronskog mikroskopa. Tim pristupom su Geisler-Lee i sur. 2013 utvrdili prisutnost agregata AgNP u staničnoj stijenci, središnjoj lameli i plazmodezmijama korijena uročnjaka.

#### 1.5. Proteomika

Proteomika se kao disciplina bavi proteomom, ukupnošću eksprimiranih proteina u biološkom sustavu, pod određenim uvjetima i u određenom trenutku. Proteomika diferencijalne ekspresije najčešće uspoređuje proteome iste vrste u kontrolnim i stresnim uvjetima (Kosova i sur. 2011). Za identifikaciju proteina koristi se spektrometrija masa (eng. *mass spectrometry*; MS). MS može precizno odrediti masu nekog spoja, u ovom slučaju proteina ili peptida, te ga prema njoj identificirati. Budući da su biološki uzorci vrlo složeni, pojednostavljivanje uzoraka kroz nekoliko koraka separacije je ključno za uspješnu analizu proteoma. Proteine najprije treba izdvojiti od ostalih tipova molekula primjerenom metodom ekstrakcije. Potom se za njihovo razdvajanje koriste elektroforetske i/ili kromatografske metode (Lenz i Dihazi, 2016). Najčešće se primjenjuje dvodimenzionalna elektroforeza u poliakrilamidnom gelu (2-DE), koja najčešće razdvaja proteine najprije po naboju, a zatim po masi. U tom slučaju se kao prva dimenzija 2-

DE koristi izoelektrično fokusiranje (IEF). Ekstrakt proteina nanese se na imobilizirani nosač pH gradijenta (imobilin), a zatim se pod utjecajem električne struje proteini, ovisno o naboju, pomiču prema katodi ili anodi sve dok ne dosegnu područje gdje pH odgovara njihovoj izoelektričnoj točki. Nakon IEF-a, imobilin se postavi okomito nad poliakrilamidni gel s natrijevim dodecilsulfatom (SDS). U drugoj dimenziji svi proteini nose negativan naboj zbog SDS-a i imaju konformaciju nasumičnog klupka, što omogućuje njihovo razdvajanje prema molekularnoj masi. Pritom manji proteini lakše prolaze kroz pore u gelu pa imaju veću mobilnost (Pavoković i Balen 2007).

Nakon vizualizacije proteina u gelu, fotografije gelova mogu se obraditi računalnim programima kako bi se utvrdio intenzitet pojedinih proteinskih mrlja i kvantificirala razlikovna ekspresija. Mrlje od interesa se mogu izrezati kako bi se identificirali proteini koji se u njima nalaze. Ako su uzorci za MS razdvojeni u gelu (za razliku od kromatografskih metoda), najčešće se ne analiziraju cjeloviti proteini, već peptidi koji nastaju njihovom razgradnjom pomoću tripsina. Peptidi su manji i po svojstvima međusobno ujednačeniji od proteina te ih se može razdvojiti i identificirati s većom rezolucijom. Prije same spektrometrije masa peptide je svakako potrebno pročistiti odsoljavanjem, na temelju kromatografije obrnutih faza. Taj korak može biti automatiziran te se može provesti dodatno kromatografsko razdvajanje na temelju hidrofobnosti, naboja, pH ili polarosti (Lenz i Dihazi 2016).

Postoje dvije metode raspršenja kojima se peptidi ili proteini mogu za potrebe MS dovesti u nabijeno stanje slično plinovitom, tako da nisu okruženi molekulama otapala i mogu putovati kroz vakuum i električno polje ovisno o svojoj masi i naboju. Prva je ionizacija elektrospreja (eng. *Electrospray Ionization*, ESI), kojom se otopina uzorka, najčešće izravno nakon tekućinske kromatografije, pri atmosferskom tlaku i visokom naponu, raspršuje kroz otvor igle mikrometarske veličine prema ulazu u vakuumsku komoru spektrometra masa. Pritom se kapljice uzorka sve više i više raspršuju, otapalo isparava, a peptidi ostaju samostalni i nabijeni. Druga metoda ionizacije je laserska desorpcija i ionizacija potpomognuta matricom (eng. *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization*, MALDI), koja se pokazala učinkovitom za analizu proteina (Karas i Hillenkamp 1988). Matricu čine male, uglavnom aromatske organske molekule sa sposobnošću apsorpcije UV svjetlosti. Peptidi se pomiješaju s matricom u velikom suvišku te se mali volumen nakapa na predviđeno mjesto na vodljivoj metalnoj pločici. Uslijed polagane evaporacije otapala, peptidi kokristaliziraju s matricom. Pločica se zatim smjesti u vakuumsku komoru instrumenta. Kad kratak puls UV lasera (ns) pogodi uzorak, matrica se rasprši zajedno s peptidima, koji dobivaju jedinični pozitivni naboj. Spektar dobre kvalitete

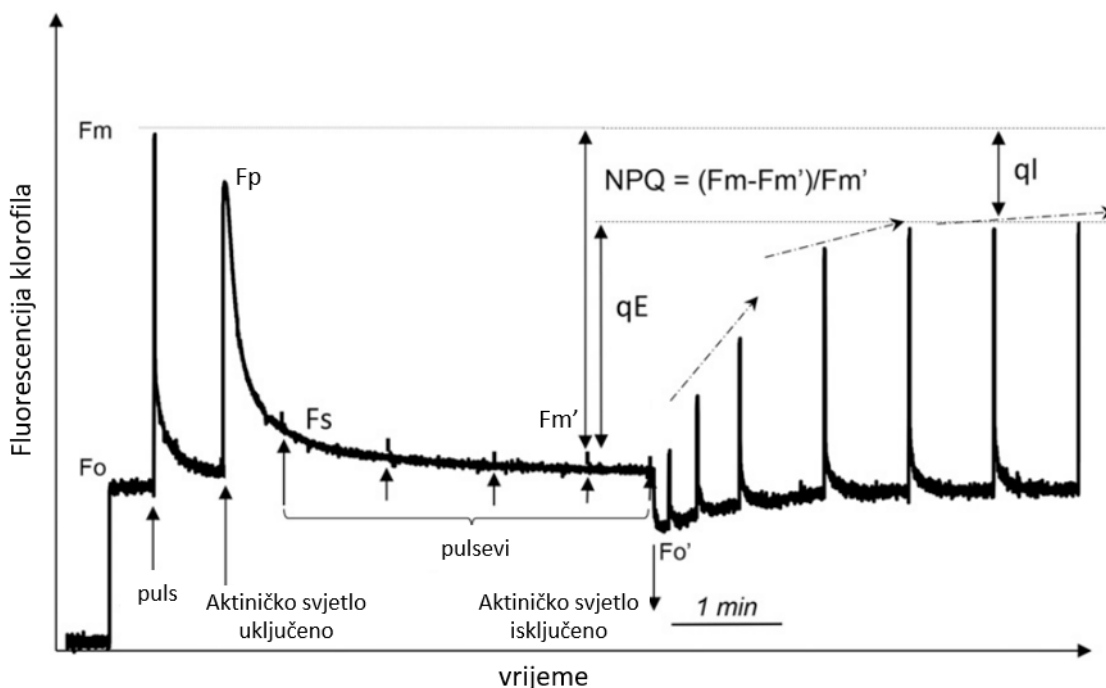
dobiva se opetovanim gađanjem uzorka laserom nekoliko stotina puta. Nakon raspršenja i ionizacije peptida, potrebno ih je u vakuumu razdvojiti i detektirati prema omjeru mase i naboja. Analizator masa TOF (eng. *Time of Flight*, vrijeme leta) prikladan je za MALDI. TOF analizator ubrzava ione analita okomito od njihovog prvotnog smjera kretanja, a zatim ih reflektira prema detektoru. Zbog ujednačenog naboja, ioni manje mase stižu na detektor prije iona veće mase. Ipak, mase peptida često nisu dovoljne da se sa sigurnošću identificira protein od kojeg potječu, te je potrebno unutar spektrometra masa dobiti informaciju o sekvenci peptida. To se postiže tandemskom spektrometrijom masa (MS/MS), gdje se nakon susreta peptidnih iona s prvim analizatorom masa ioni određene mase izdvoje, a zatim rascijepa na ione-potomke uslijed sudara s inertnim plinom. Ioni-potomci se upućuju da drugi analizator masa, a prema razlici u njihovim masama može se odrediti sekvenca peptida. Proteini se identificiraju pomoću uzorka masa fragmenata peptida (eng. *Peptide Fragment Fingerprinting*), koji se uspoređuje sa računalno predviđenim uzorcima peptida, kakvi bi nastali tripsinskom digestijom proteina iz baze podataka proteinskih sekvenci te fragmentacijom njihovih peptida. Zbog toga je poželjno da proučavani organizam ima sekvenciran i anotiran genom. Prema slaganju opaženih uzoraka sa predviđenima, rezultatima se dodjeljuje bodovna vrijednost (eng. *score*) te se prihvaćaju oni rezultati kojima *score* prelazi određeni prag (Lenz i Dihazi 2016).

Istraživanja biljnog proteoma doprinijela su razumijevanju raznih vrsta abiotičkog stresa kod biljaka (Kosova i sur. 2011), no upotreba proteomike u istraživanju utjecaja nanočestica na biljke tek je u povojima (Hossain i Komatsu 2013., Hossain i sur. 2015). Vannini i sur. (2013) su istražili utjecaj PVP-AgNP i iona srebra na proteom biljke *Eruca sativa* te uočili različit odgovor na ione i nanočestice. Dok su u odgovoru na ione sudjelovali većinom proteini s funkcijama u obrani i stresu te metabolizmu, u odgovoru na nanočestice ove funkcionalne skupine nadmašuju skladišni proteini i regulatori sinteze proteina, a uključeni su i proteini zaduženi za transport i stanični ciklus. Mirzajani i sur. su 2014. proučili utjecaj AgNP na korijen riže i primijetili da AgNP uzrokuju promjenu razine ekspresije proteina, no nova pojavnost ili odsutnost proteina nije uočena. Među proteinima čija se ekspresija mijenja pod utjecajem AgNP pronađeni su oni koji sudjeluju u odgovoru na oksidativni stres, u obrambenim signalnim putevima, apoptozi, sintezi i degradaciji proteina te signalni proteini koji vežu ione kalcija. Sudjelovanje AgNP u promjeni ekspresije proteina vezanih stres, signalizaciju i stanični metabolizam potvrdili su i Mustafa i sur. 2015. na klijancima soje podvrgnutima vodnom stresu. Oni su također pokazali da AgNP, iako letalne u većim koncentracijama, u niskoj koncentraciji

potpomažu rast klijanaca soje u uvjetima vodnog stresa. Budući da je utjecaj AgNP i drugih vrsta nanočestica na biljni proteom slabo istražen, svaki doprinos ovom području ima značaj. Dosadašnja istraživanja proučavala su promjene uzrokovane AgNP u različitim koncentracijama i različitim veličinama AgNP, no nisam pronašla niti jedno koje se fokusira na promjene proteoma pod utjecajem AgNP s različitim omotačima.

#### 1.6. Fluorescencija klorofila

Fluorescencija klorofila je metoda koja se zbog neinvazivnosti i jednostavnosti primjene često koristi u fiziologiji bilja (Kalaji i sur. 2016). Temelji se na jednostavnom principu: energija koju molekule klorofila prime apsorpcijom fotona može se osloboditi na tri načina, i to tako da se upregne u reakcije fotosinteze, što se još naziva fotokemijom, da se osipa kao toplina ili da se emitira u obliku svjetlosti niže valne duljine, što se naziva fluorescencijom. Ti procesi su međusobno zavisni te se promjena jednog kompenzira promjenom ostala dva, stoga iz promjene u fluorescenciji klorofila možemo zaključivati o učinkovitosti fotosinteze (pregled u Maxwell i Johnson 2000). Prije mjerenja fluorescencije potrebno je listove prilagoditi tami kako bi se lanac prijenosa elektrona i Calvinov ciklus ugasili. Za to je potrebno najmanje 20 min (Murchie i Lawson 2013). Kada se list prilagođen tami obasja svjetlom, fluorescencija klorofila naglo naraste, a zatim se polagano gasi (Slika 1). To gašenje se događa zbog pokretanja reakcija fotosinteze (fotokemijsko gašenje fluorescencije klorofila, qP) i zbog osipanja energije u obliku topline (nefotokemijsko gašenje fluorescencije klorofila, eng. *nonphotochemical quenching*, NPQ). Primjenom pulseva mjerne svjetlosti niskog intenziteta, saturacijskih pulseva svjetlosti visokog intenziteta koji potpuno zasite fotosustav II (PSII), te aktiničkog svjetla umjerenog intenziteta koje podržava svjetlosne reakcije fotosinteze, moguće je iz promjena u fluorescenciji klorofila odrediti brojne parametre (Tablica 1) koji opisuju stanja i procese vezane uz funkcioniranje PSII.



Slika 1: Prikaz tipičnog mjerenja fluorescencije klorofila u tami prilagođenom listu pomoću fluorometra s modulirajućom amplitudom pulsa uz poticanje i relaksaciju NPQ (preuzeto i prilagođeno prema Rubanu, 2016). Prikazani parametri označavaju minimalnu ( $F_0$ ) i maksimalnu fluorescenciju ( $F_m$ ), fluorescenciju pri uključivanju aktiničkog svjetla ( $F_p$ ), fluorescenciju u ustaljenom stanju ( $F_s$ ), maksimalnu fluorescenciju tijekom trajanja aktiničkog osvjetljenja ( $F_m'$ ), minimalnu fluorescenciju po njegovu prestanku ( $F_0'$ ), nefotokemijsko gašenje fluorescencije (NPQ) te njegove komponente  $qE$  i  $qI$ .

Tablica 1: Pregled najvažnijih parametara fluorescencije klorofila izvedenih iz vrijednosti fluorescencije prikazanih na slici 1.

Parametar	Formula	Značenje
$F_v$	$F_m - F_0$	Varijabilna fluorescencija
$QY_{\max}$	$F_v / F_m$	Maksimalni kvantni prinos PSII – mjera udjela funkcionalnih jedinica PSII
$QY$	$\frac{F_m' - F_0}{F_m'}$	Efektivni kvantni prinos PSII – udio apsorbiranih fotona koji se koriste u fotokemijskim reakcijama
NPQ	$\frac{F_m - F_m'}{F_m'}$	Nefotokemijsko gašenje fluorescencije
$qP$	$\frac{F_m' - F_s'}{F_m' - F_0'}$	Fotokemijsko gašenje fluorescencije – udio otvorenih jedinica PSII



Kako bismo mjerili NPQ, potrebno je otkloniti utjecaj fotokemijskog gašenja. To se postiže primjenom kratkog ( $< 1$  s) saturacijskog pulsa svjetlosti visokog intenziteta koji trenutno i privremeno zasiti sve reakcijske centre PSII. Fluorescencija tada dosegne razinu kakvu bi imala u odsustvu fotokemijskog gašenja. Ako se takav puls primjeni na listu prilagođenom tami, dobijemo maksimalnu vrijednost fluorescencije klorofila ( $F_m$ ) i može se izračunati maksimalni kvantni prinos PSII ( $QY_{max}$ ). To je najčešće korišteni parametar fluorescencije klorofila, a označava udio funkcionalnih jedinica među populacijom PSII. Vrijednost  $QY_{max}$  u većini biljaka u normalnim uvjetima iznosi oko 0,83, a vrijednosti manje od te ukazuju na stres i fotoinhibiciju (Roháček 2002).

Nefotokemijsko gašenje, za razliku od fotokemijskog, nije moguće inhibirati pa se procjene fotokemijskog gašenja mogu izražavati samo u odnosu na tami prilagođeno stanje (Maxwell i Johnson, 2000). Za NPQ nije zaslužan samo jedan proces, nego njih nekoliko koji se razlikuju po kinetici. Brzo relaksirajuća komponenta NPQ je gašenje ovisno o energiji,  $qE$ , zaslužno za glavninu NPQ. Zasniva se na porastu gradijenta  $H^+$  iona koji pohranjuje energiju u kloroplastu, tj. na padu pH tilakoidnog lumena uslijed jačeg osvjetljenja. U takvim uvjetima aktivira se violaksantin-deepoksidaza, pokreće se ksantofilski ciklus te on, uz protonaciju aminokiselinskih ostataka okrenutih prema lumen, potiče konformacijske promjene kompleksa antena LHCII (eng. *light harvesting complex II*). Posljedično neke komponente LHCII kompleksa disociraju, reakcijski centri PSII se okupljaju, a fluorescencija klorofila se gasi (Ruban 2016). Neki autori izdvajaju gašenje zbog konformacijskih promjena i tranzicije LHCII kao posebnu komponentu,  $qT$ . Komponenta  $qE$  reagira u roku od nekoliko sekundi ili minuta i omogućuje prilagodbu na varijabilno osvjetljenje. Sporo relaksirajuća komponenta NPQ je  $qI$ , uzrokovan oštećenjima PSII uslijed fotoinhibicije. Za njenu relaksaciju potrebni su sati te je manje istražena (Müller i sur. 2001).

Mjerenje parametara fluorescencije klorofila nije potpuno bez mjerenja sadržaja fotosintetskih pigmenta. Sadržaji klorofila *a*, klorofila *b* i karotenoida mogu se u istom uzorku odrediti spektrofotometrijski metodom po Lichtenthaleru (1987).

Poznato je da ioni teških metala utječu na fotosintetsku učinkovitost biljaka. Ioni kroma utječu na mnoge parametre fotosinteze klijanaca pšenice te među njima treba istaknuti drastičan pad  $QY_{max}$  i  $qP$  i porast NPQ (Tripathi i sur. 2015). Količina klorofila je smanjena u vodenoj leći tijekom tretmana ionima i nanočesticama srebra i to ovisno o koncentraciji, a primijećen je i pad  $QY_{max}$ , i to veći u slučaju tretmana ionima (Jiang i sur. 2012). Falco i sur. su 2015. dokazali

da AgNP u interakciji s ekstraktom fotosintetskih pigmenata gase fluorescenciju klorofila. Budući da AgNP mogu ući u biljna tkiva i naći se u blizini fotosintetskih membrana, AgNP bi mogle i direktno utjecati na NPQ.

## 2. Cilj istraživanja

Nanočestice srebra imaju mnogo primjena i prisutne su u mnogim komercijalno dostupnim proizvodima te začuđuje kako se o njihovom utjecaju na zdravlje ljudi i okoliša malo zna. Mnoga istraživanja ukazuju na štetnost AgNP za svakojake skupine živih organizama te na njihovu fitotoksičnost. Dosadašnja istraživanja fokusirala su se uglavnom na usporedbu učinka AgNP u različitim koncentracijama te na učinke različitih veličina nanočestica. Ulozi raznovrsnih omotača nanočestica nije posvećena dovoljna pažnja, stoga svojim radom želim doprinijeti tom području. Promjene u biljnom proteomu pod utjecajem nanočestica nisu naročito istražene, kao ni parametri fluorescencije klorofila. Za procjenu toksičnosti posebno je važna i analiza strukture i ultrastrukture biljnih tkiva i stanica. Utjecaj raznovrsnih AgNP i iona srebra proučila sam na modelu klijanaca duhana. Rane faze razvoja vrlo su važne za pravilan rast biljke te su klijanci raznih biljnih vrsta čest model u toksikologiji, a duhan je, kao komercijalno važna kultura i uvriježen modelni organizam u molekularnoj biologiji dobar izbor za istraživanje.

Svojim diplomskim radom želim:

- utvrditi utječe li ispitivana koncentracija AgNP s različitim omotačima (AgNP-citrat, AgNP-PEG i AgNP-bPEI) i ionskog srebra ( $\text{AgNO}_3$ ) na morfologiju stanica kotiledona i korijenovog vrška duhana te na duljinu korijena
- identificirati proteinske biljege među ukupnim topivim proteinima klijanaca duhana čija se ekspresija mijenja pod utjecajem AgNP s različitim omotačima i ionskog srebra
- ispitati utjecaj AgNP s različitim omotačima i ionskog srebra na fotosintetsku učinkovitost spektrofotometrijskim mjerenjem pigmenata te mjerenjem fluorescencije klorofila
- usporediti učinke AgNP s različitim omotačima te ionskog srebra iste koncentracije

### 3. Materijali i metode

#### 3.1. Materijali

##### 3.1.1. Nanočestice srebra (AgNP)

U ovom radu su, uz ionsko srebro ( $\text{AgNO}_3$ ), korištene komercijalno dostupne nanočestice srebra veličine 50 nm, stabilizirane pomoću tri vrste omotača: negativno nabijenog citratnog aniona (citrat), pozitivno nabijenog razgranatog polietilenimin kationa (bPEI) i neutralnog polietilen-glikola (PEG). Dakle, u ovom istraživanju korištene su tri različite vrste nanočestica srebra: negativno nabijene (AgNP-citrat), pozitivno nabijene (AgNP-bPEI) te neutralne (AgNP-PEG) nanočestice. Nanočestice srebra su kupljene od nanoComposix kompanije, NanoTech Partner s.r.o., Prag, Češka Republika. Promjer i veličina čestica okarakterizirani su transmisijskim elektronskim mikroskopom „JEOL 1010“. Masena koncentracija određena je instrumentom „Thermo Fisher X-Series 2 ICP-MS“. Karakterističan spektar određen je UV/VIS spektrofotometrom „Agilent 8453“, a zeta potencijal uređajem „Malvern Zetasizer Nano ZS“ (Prilog 1, Slike P1, P2, P3).

##### 3.1.2. Biljni materijal

Istraživanje sam provedela na klijancima duhana (*Nicotiana tabacum* L.) sorte Burley. Sjemenke duhana dobivene su od Duhanskog instituta Zagreb d.o.o. (Zagreb, Hrvatska). U svim tretmanima sa nanočesticama srebra i ionskim srebrom koristila sam 0,04 g sjemenki duhana. Sjemenke sam prvo površinski sterilizirala u natrijevom hipokloritu ( $\text{NaOCl}$ ) i autoklaviranoj destiliranoj vodi ( $\text{aH}_2\text{O}$ ) u omjeru 1:1 (500  $\mu\text{L}$   $\text{NaOCl}$  i 500  $\mu\text{L}$   $\text{deH}_2\text{O}$ ) nakon čega su 15 minuta inkubirane na tresilici (vorteks). Sjemenke sam potom 5 puta isprala s  $\text{aH}_2\text{O}$  (750  $\mu\text{L}$  po ispiranju) u biljnom laminaru koristeći isključivo autoklavirane nastavke za mikropipete, pazeći da njima ne dotaknem vanjski, nesterilni dio tubice. Nakon petog ispiranja, umjesto vode sam dodala 500  $\mu\text{L}$   $\frac{1}{2}\text{MS}$  tekućeg medija (promijenjen hranidbeni medij prema Murashigeu i Skoogu (1962) s polovičnom koncentracijom makroelemenata i autoklaviran; Tablica 2). Sjemenke sam dodala u sterilni hranidbeni medij s koncentracijom nanočestica srebra (AgNP) stabiliziranih trima različitim omotačima (citrat, PEG i bPEI), u konačnoj vrijednosti od 100  $\mu\text{M}$ , kao i u medij s ionskim srebrom ( $\text{AgNO}_3$ ) iste koncentracije (Tablica 3). Matične otopine AgNP molarne koncentracije 194,6  $\mu\text{M}$  sam prije korištenja za tretman pofiltrirala pomoću 0,45  $\mu\text{m}$  filtra (Sartorius, Njemačka) kako bih uklonila eventualne bakterijske stanice u otopini.

Tablica 2: Sastav modificiranog hranidbenog medija Murashige-Skoog s polovičnom koncentracijom makroelemenata ( $\frac{1}{2}$ MS).

Sastojci	Matična otopina	$\frac{1}{2}$ MS
KNO <sub>3</sub>	95 g	5 mL
deH <sub>2</sub> O	Do 500 mL	
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	82,2 g	5 mL
deH <sub>2</sub> O	Do 500 mL	
MgSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O	18,5 g	5 mL
deH <sub>2</sub> O	Do 500 mL	
CaCl <sub>2</sub> × 2 H <sub>2</sub> O	37,78 g	5 mL
deH <sub>2</sub> O	Do 500 mL	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	8,5 g	5 mL
deH <sub>2</sub> O	Do 500 mL	
NaEDTA	3,77 g	2,5 mL
FeSO <sub>4</sub>	2,78 g	
deH <sub>2</sub> O	Do 500 mL	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3,1 g	1 mL
MnSO <sub>4</sub> × H <sub>2</sub> O	8,45 g	
ZnSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O	4,3 g	
KI	415 mg	
NaMoO <sub>4</sub> × 2 H <sub>2</sub> O	125 mg	
CuSO <sub>4</sub> × 5 H <sub>2</sub> O	12,5 mg	
CoCl <sub>2</sub> × 6 H <sub>2</sub> O	12,5 mg	
deH <sub>2</sub> O	Do 500 mL	
B1		100 µL
Myo-inozitol		0,10 g
MES [2-(N-morfolino)etanosulfonična kiselina]		0,50 g
Saharoza		15 g
pH		5,9
deH <sub>2</sub> O		Do 1 L

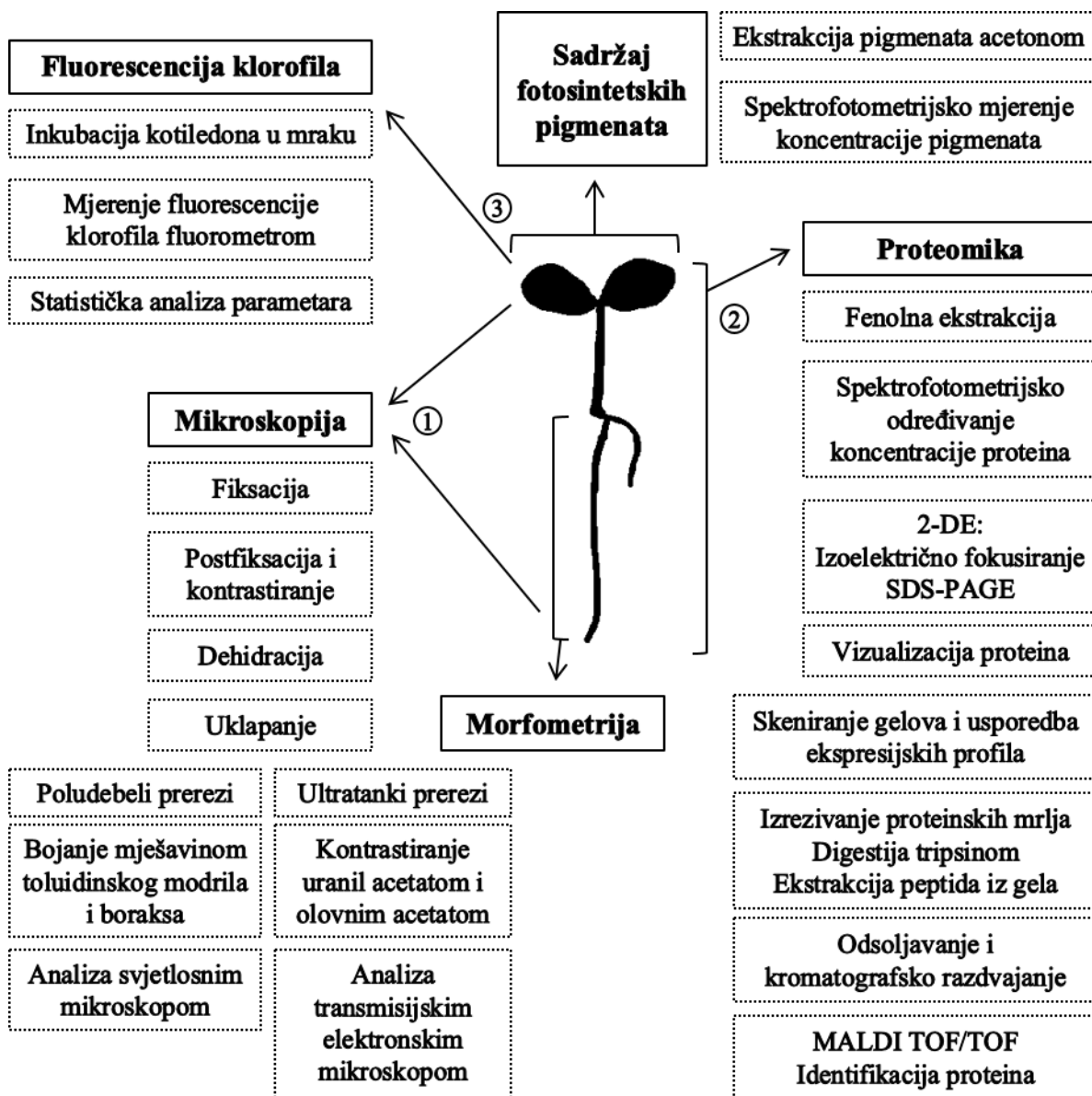
Matičnu otopinu srebrovog nitrata ( $\text{AgNO}_3$ ) molarne koncentracije 10 mM, prije svakog tretmana svježe sam pripremila u  $\text{reH}_2\text{O}$ . Kao posude za isključavanje koristila sam staklene Erlenmeyerove tikvice veličine 200 mL, pokrivene vatom i aluminijskom folijom te sterilizirane u autoklavu. U biljnom laminaru, koristeći sterilno posuđe i pribor, pažljivo sam otklopila sterilizirane tikvice, dodala prvo  $\frac{1}{2}\text{MS}$ , a potom nanočestice srebra različitih omotača i ionskog srebra prema Tablici 3 te na kraju sterilizirane sjemenke. Tikvice sam poklopila pripadajućom vatom, zapalila vatu na plameniku te odmah poklopila pripadajućom aluminijskom folijom, kako bi rub tikvice ostao sterilan. Tikvice sa sjemenkama na tretmanu posložila sam na miješalicu u klimakomori. Isključavanje je trajalo 10 dana u uvjetima dugog dana (16 h osvjetljenje, 8 h mrak, 25 °C) i intenziteta svjetla  $90 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Nakon 10 dana tretmana koristila sam klijance u tri eksperimentalna smjera.

Tablica 3: Sastav otopina za isključavanje po tikvici.

	<b>Volumen hranjivog medija <math>\frac{1}{2}</math> MS (mL)</b>	<b>Volumen matične otopine tretmana</b>	<b>Masa sjemenki duhana (g)</b>
Kontrola	5	-	0,04
Tretman sa 100 $\mu\text{M}$ $\text{AgNO}_3$	5	50 $\mu\text{L}$	0,04
Tretman sa 100 $\mu\text{M}$ $\text{AgNP-bPEI}$	2,57	2,43 mL	0,04
Tretman sa 100 $\mu\text{M}$ $\text{AgNP-citrat}$	2,57	2,43 mL	0,04
Tretman sa 100 $\mu\text{M}$ $\text{AgNP-PEG}$	2,57	2,43 mL	0,04

### 3.2. Metode

Pregled svih metoda prikazan je na Slici 2. Biljni materijal korišten je u tri eksperimentalna smjera: morfometrija i mikroskopija (1), proteomika (2) i fotosinteza (3).



Slika 2: Shematski prikaz metoda u tri eksperimentalna smjera.

### 3.2.1. Morfometrija i mikroskopija

#### 3.2.1.1. Morfometrija korijena klijanaca duhana

Izabrala sam po tri reprezentativna klijanca iz kontrolne skupine i svake od tretiranih skupina. Klijancima sam izmjerila duljinu korijena, a podatke statistički obradila u programu Statistica13.1, koristeći Duncanov post-hoc ANOVA test uz  $p < 0,05$ .

#### 3.2.1.2. Svjetlosna i elektronska mikroskopija

Za analizu strukture i ultrastrukture koristila sam kotiledone i korijenov vršak klijanaca. Postupak pripreme uzoraka provela sam prema Peharec Štefanić i sur. (2013). Za fiksaciju i postfiksaciju potreban je 0,5 M kakodilatni pufer, koji se priprema iz 2 M matične otopine. Za matičnu otopinu treba otopiti 4,28 g natrijevog kakodilata u 100 mL deH<sub>2</sub>O te pH namjestiti na 7,2. Pufer se razrijedi prije upotrebe na koncentraciju 0,5 M, dodavanjem deH<sub>2</sub>O na 25 mL 2 M matične otopine do 100 mL. Pomoću skalpela i pincete odrezala sam s klijanaca cijele kotiledone te vršak korijena duljine 2-3 mm, pazeći da ih pritom ne oštetim. Fiksirala sam ih, uronivši ih u tubicu s 2% glutaraldehidom u 0,5 M kakodilatnom puferu pH vrijednosti 7,2 kroz 30 min pri 1 °C. Nakon fiksacije sam isprala uzorke tkiva dva puta s po 1 mL kakodilatnog pufera, također pri 1 °C. Slijedi postfiksacija u 1% osmijevom tetroksidu u kakodilatnom puferu, 60 min pri 1 °C. Potom sam isprala uzorke u deH<sub>2</sub>O, 10 min pri 1 °C.

Nakon postfiksacije slijedi dehidracija u serijama etanola rastuće koncentracije, pri sobnoj temperaturi. Etanol sam stavila u tubice s uzorcima i inkubirala ih 10 min, a potom izvadila tekućinu i ponovila postupak s većom koncentracijom etanola. Inkubirala sam uzorke redom u 50%, 60%, 70%, 80% i 96% etanolu, a potom ih prebacila u 100% etanol na inkubaciju preko noći. Zatim sam zamijenila etanol sa smjesom 1:1 100% etanola i acetona te inkubirala uzorke 30 min. Potom sam i tu smjesu uklonila te uzorke inkubirala u čistom acetonu 30 min.

Nakon dehidracije slijedi uklapanje u epoksidnu smolu (Spurrovo sredstvo), koje se izvodi na sličan način. Dehidrirane komadiće tkiva stavila sam najprije u smjesu acetona i Spurrovog sredstva u omjeru 3:1 i inkubirala 30 min, zatim sam isto ponovila smjesama omjera 1:1 te 1:3, a naposljetku sam uzorke stavila u 100% Spurrovo sredstvo i inkubirala ih 3 h pri 40 °C. U kalupe za uklapanje stavila sam sitne papiriće s oznakama i namjestila komadiće tkiva uz gornji rub kalupa tako da dobijem uzdužne prereze korijena i poprečne prereze kotiledona, a zatim sam ih pokrila Spurrovim sredstvom. Sredstvo s uklopljenim uzorcima polimerizira se pri 65



°C tijekom 48 h. Nakon polimerizacije, sredstvo za uklapanje očvrstne te je pogodno za pripremu poludebelih prereza (1  $\mu$ m) za svjetlosnu mikroskopiju i ultratankih prereza (50 – 90 nm) za TEM pomoću ultramikrotoma.

Poludebele prereze za svjetlosnu mikroskopiju izradila sam pomoću modela ultramikrotoma Sorvall RMC, Mt6000-XL, Njemačka. Prereze sam prenijela na predmetno stakalce pomoću staklenog štapića u kapljicu 10% acetona. Predmetnicu sam zatim zagrijala iznad šištećeg plamena kako bi aceton ispario, a prerez se zalijepio za stakalce. Potom sam obojila prerez, pomiješavši na stakalcu kapljicu 2% toluidinskog modrila i kapljicu 2% boraksa. Zatim sam stakalce zagrijavala na plinskom plameniku, provlačeći ga kroz plamen tijekom 10 s. Nakon toga sam višak boje isprala pod tekućom vodom i pokrila prerez pokrovnicom. Uzorke sam promatrala pod svjetlosnim mikroskopom (model BX5I, Olympus, Japan) te ih snimila digitalnom kamerom (model DP70, Olympus, Japan).

Ultratanke prereze za TEM izradila sam pomoću modela ultramikrotoma Ultracut R, Leica, Njemačka. Ultratanke prereze koji su plivali na površini vode u bazenčiću staklenog noža za rezanje sam dotaknula bakrenom mrežicom presvučenom Formvarom te naparenom ugljikom. Na ovaj način su se prerezi zalijepili za mrežicu te sam ih dodatno kontrastirala 4% vodenom otopinom uranil acetata kroz 10 minuta, a zatim 10 min olovnim citratom, pH vrijednosti 12 (Reynolds 1963). Analizirala sam ih transmisijskim elektronskim mikroskopom (model Morgagni 268D, FEI, Nizozemska) pri 70 kV.

### 3.2.2. Proteomika

#### 3.2.2.1. Ekstrakcija ukupnih proteina

Za ekstrakciju ukupnih proteina koristila sam metodu fenolne ekstrakcije prema Faurobert i sur. (2007). Kljance sam izvadila iz tikvica te pomoću papirnatih ručnika uklonila višak tekućine, a zatim ih izvagala na aluminijskoj foliji. Kako bih sakupila oko 1,5 g svježeg tkiva cijelih kljanaca, morala sam okupiti kljance iz dvije do tri tikvice s istim tretmanom. Postupak ekstrakcije izvodi se na ledu, a svi puferi i pribor moraju biti prethodno ohlađeni. Pufer za ekstrakciju (Tablica 4) pripremila sam otopivši redom sve sastojke osim fenilmetilsulfonil fluorida (PMSF) i  $\beta$ -merkaptetoanola u reH<sub>2</sub>O na magnetskoj miješalici. PMSF sam neposredno prije upotrebe otopila u izopropanolu, vorteksirala i dodala u pufer, a potom sam, radeći u digestoru, dodala i  $\beta$ -merkaptetanol. Svježe tkivo prebacila sam pomoću spatule u hladni tarionik u kutiji s ledom, dodala polivinilpirolidon (PVP) na vrh spatule (oko 50 mg) te tučkom

usitnila tkivo. Zatim sam dodala tekući dušik i usitnila tkivo u fini prah. Usitnjeno tkivo pomiješala sam postupno s 3 mL ekstrakcijskog pufera, ulila u *Falcon* tubu i dobro protresla na vorteksu. Zatim sam položila tube horizontalno u posudu s ledom i inkubirala 10 min na miješalici.

Tablica 4: Sastav pufera za ekstrakciju.

Tris	3,0285 g
EDTA	0,9306 g
Saharoza	11,9805 g
KCl	0,3728 g
HCl	Do pH vrijednosti 8,0
reH <sub>2</sub> O	Do 50 mL
PMSF	0,0087 g
izopropanol	1 mL
β-merkaptoetanol, 2%	1 mL

Nakon isteka vremena, radeći u digestoru, dodala sam po 3 mL fenola na uzorke, pazeći da pri pipetiranju ne zahvatim zaštitni sloj na površini. Uzorke sam vorteksirala i ponovno inkubirala 10 min na ledu u miješalici. Potom sam uzorke centrifugirala 20 min na +4 °C i 5500 g (centrifuga Sigma 3K30). Nakon centrifugiranja, uzorak je podijeljen u tri faze te je za nastavak potrebno otpipetirati gornju, fenolnu fazu u čistu 15 mL tubu. Na uzorke sam potom dodala 3 mL ekstrakcijskog pufera, kako bih isprala fenol iz uzoraka te sam ih vorteksirala i inkubirala 3 min na ledu na miješalici i ponovno centrifugirala pod istim uvjetima. Supernatant sam prebacila u novu tubu i na njega dodala četverostruki volumen ledeno hladne precipitacijske otopine, koju sam pripremila otopivši 0,77 g amonijevog acetata u 100 mL metanola te ohladila na -20 °C. Uzorke sam promiješala izvrtanjem te ostavila u okomitom položaju na -20 °C da se proteini istalože preko noći.

Drugi dan sam centrifugirala uzorke 20 min na +4 °C i 5500 g (Sigma 3K30) te izlila supernatant i zadržala talog. Talog sam isprala tri puta s po 3 mL ledene precipitacijske otopine te još jednom s 3 mL ledenog acetona. Talog sam svaki put resuspendirala pomoću 5 mL pipete i centrifugirala 10 min na +4 °C i 5500 g. Tijekom ispiranja koristila sam svaki put iste nastavke

za pipete jer na njima ostaju komadići proteinskog taloga. Nakon zadnjeg ispiranja, pustila sam da se talog osuši u digestoru, a zatim ga otopila u 500  $\mu$ L pufera za izoelektrično fokusiranje (IEF pufer, Tablica 5). Prilikom pripreme IEF pufera, čašu u kojoj se otapaju urea i 3-[(3-kolamidopropil)dimetilamonijev]-2-hidroksi-1-propansulfonat (CHAPS) potrebno je držati u posudi s toplom vodom (30-40 °C) kako urea ne bi kristalizirala. Alikvoti pufera mogu se čuvati na -80 °C, a ditiotreitol (DTT) i amfolite treba otopiti neposredno prije upotrebe. Uzorci se nakon dodavanja IEF pufera više ne moraju čuvati na ledu. Talog sam resuspendirala u puferu pazeći da se ne zapjeni, te sam ga dodatno inkubirala na miješalici kroz 10 min kako bih razbila eventualne grudice taloga preostale nakon resuspendiranja pipetom. Nakon dodatne inkubacije, po potrebi sam inkubirala uzorke u ultrazvučnoj kupelji (model Sonorex, Bandelin, Njemačka) oko 45 s da se eventualni preostali talog čim bolje razbije. Otopljene uzorke prebacila sam u 1,5 mL tubice te ih centrifugirala 5 min pri 20 °C na 20800 g (centrifuga Eppendorf, Njemačka). Potom sam supernatant prebacila u čiste tubice te odredila koncentraciju proteina.

Tablica 5: Sastav pufera za izoelektrično fokusiranje

Urea	5,4 g
CHAPS	0, 2 g
reH <sub>2</sub> O	Do 10 mL
DTT	20 mg
Amfoliti	52 $\mu$ L

### 3.2.2.2. Određivanje koncentracije proteina

Koncentraciju proteina u ekstraktima odredila sam modificiranom metodom po Bradfordu (Bradford 1976), koja tolerira komponente IEF pufera (Ramagli i sur. 1985). Matičnu i radnu Bradford otopinu (Tablice 6 i 7) pripremila sam prema protokolu u Balen i sur. (2011), a potrebno ih je čuvati u tamnoj boci i pri sobnoj temperaturi. Radnu otopinu treba prije upotrebe profiltrirati kroz *Whatman No. 1* filter-papir.

U *Falcon* tubama pripremila sam prema Tablici 8 uzorke i dvije slijepe probe za mjerenje koncentracije proteina. Nakon kratkog vorteksiranja inkubirala sam tube 10 min u mraku. Potom sam mjerila apsorbanciju spektrofotometrijski (model UV/VIS, Unicam, Engleska) pri

valnoj duljini 595 nm, koristeći plastične kivete. Koncentraciju proteina u u uzorcima odredila sam očitavanjem s baždarne krivulje dobivene mjerenjem apsorbancije otopina albumina goveđeg seruma (eng. *Bovine Serum Albumin*, BSA) poznatih koncentracija (0,2 – 2,0 mg/mL) pripremljenih u IEF puferu.

Tablica 6: Sastav Bradford matične otopine.

96% etanol	100 mL
88% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	200 mL
CBB G-250	350 mg
deH <sub>2</sub> O	Do 300 mL

Tablica 7: Sastav Bradford radne otopine.

96% etanol	15 mL
88% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	30 mL
Bradford matična otopina (Tablica 6)	30 mL
deH <sub>2</sub> O	Do 500 mL

Tablica 8: Priprema uzoraka za određivanje koncentracije proteina po Bradfordu.

Uzorci		Slijepa proba	
0,1 M HCl	10 µL	0,1 M HCl	10 µL
Uzorak	20 µL	IEF pufer	20 µL
reH <sub>2</sub> O	70 µL	reH <sub>2</sub> O	70 µL
Bradford radna otopina (Tablica 7)	3,5 µL	Bradford radna otopina	3,5 µL

### 3.2.2.3. Razdvajanje proteina dvodimenzionalnom elektroforezom u denaturirajućim uvjetima

#### 3.2.2.3.1. Rehidracija imobilina

Izjednačila sam uzorke po koncentraciji proteina prema uzorku najmanje koncentracije, razrijedivši koncentriranije uzorke puferom za izoelektrično fokusiranje. U svaki sam dodala 5  $\mu$ L bromfenol plavog, kratko vorteksirala te centrifugirala 5 min na 20800 g pri sobnoj temperaturi (Eppendorf, Njemačka). U žljebove posude za rehidraciju otpipetirala sam po 400  $\mu$ L svakog proteinskog uzorka i u njih uronila 13 cm duge imobiline za izoelektrično fokusiranje (nelinearni gradijentni gel pH 3 – 10; GE Healthcare, Švedska) te ih prekrila s po 900  $\mu$ L ulja za natkrivanje i ostavila da se rehidriraju preko noći na sobnoj temperaturi.

#### 3.2.2.3.2. Prva dimenzija - izoelektrično fokusiranje

Kao prvu dimenziju razdvajanja koristila sam izoelektrično fokusiranje (IEF) (Bjellquist i sur. 1982). Rehidriane imobiline ocijedila sam naslonivši ih na papirnati ručnik, a zatim postavila na keramičku podlogu uređaja za IEF (model Ettan IPGphor 3, GE Healthcare, UK). Pritom je važno da se imobilini postave u pravilnoj orijentaciji i položaju s obzirom na dužinu gela, a broj imobilina je važan pri odabiru programa. Elektrode papiriće navlažene s deH<sub>2</sub>O postavila sam na krajeve imobilina, tako da jedna njihova polovica bude iznad gela, a druga izvan. Postavila sam nosače s elektrodama tako da sjednu na gel i elektrodni papirić, a cijelu podlogu sam prekrila s 110 mL ulja za natkrivanje. Pokrenula sam IEF prema uvjetima u Tablici 9. Po završetku IEF, koji je trajao nešto malo više od 30 000 VhT (ukupnih volt sati), imobiline sam ocijedila i pohranila na -80 °C.

Tablica 9: Uvjeti izoelektričnog fokusiranja

Korak	Porast napona	Ostvareni napon (V)	Trajanje (h)
1	Gradient	500	1:00
2	Gradient	1000	1:00
3	Gradient	8000	1:00
4	Hold	8000	8:00

### 3.2.2.3.3. Ekvilibracija imobilina

Prije provedbe druge dimenzije 2-DE, ekvilibrirala sam imobiline po 15 min na miješalici, prvo u 2,5 mL otopine DTT-a u ekvilibracijskom puferu (Tablica 10), a zatim u 2,5 mL otopine jodacetamida (IAA) u ekvilibracijskom puferu.

Tablica 10: Sastav pufera za ekvilibraciju.

Urea	9 g
1,5 M Tris-HCl pH 8,8 (Tablica 9)	0,83 mL
20% SDS	2,5 mL
reH <sub>2</sub> O	Do 25 mL
DTT	100 mg u 5 mL
IAA	125 mg u 5 mL

### 3.2.2.3.4. Druga dimenzija – SDS-PAGE

U drugoj dimenziji razdvojila sam proteine prema masi vertikalnom elektroforezom u denaturirajućim uvjetima (Laemmli 1970). Koristila sam sustav PROTEAN II xi cell, Bio-Rad, SAD, koji se sastoji od stalka, dva para držača za stakla, većeg i manjeg stakla te razmaknica. Nakon sastavljanja, treba provjeriti ispušta li kalup tekućinu te po potrebi ponoviti sastavljanje. Otopinu za 12% poliakrilamidni gel s SDS-om (Tablica 11) pripremila sam prema Balen i sur. (2011). Za pripravu gela potreban je 1,5 M Tris-HCl pufer pH vrijednosti 8,8 koji se dobije otapanjem 18,2 g 2-amino-2-hidroksimetil-propan-1,3-diola (Tris) u 100 mL reH<sub>2</sub>O, a pH vrijednost se namjesti pomoću 6 M HCl. Također je potrebna 30% otopina akrilamida (AA) i N,N'-metilen-bis-akrilamida (Bis), koja se priprema otapanjem 29,2 g AA i 0,8 g Bis u 100 mL reH<sub>2</sub>O. Zbog toksičnosti AA i Bis treba vagati sa zaštitnom maskom u digestoru. Dodatkom amonijevog peroksodisulfata (APS) i N,N,N',N'-tetrametiletildiamina (TEMED) pokreće se polimerizacija pa nakon dodatka ovih sastojaka otopinu treba brzo uliti u kalupe. Pipetom sam ulila 30 mL otopine u razmak između stakala do razine oko 1 cm ispod nižeg stakla te pomoću kapaljke natkrila gel tankim slojem reH<sub>2</sub>O i pustila da se polimerizira oko 1 h. Kad je gel polimeriziran, granica gela i vode postaje lako uočljiva te vodu treba izliti prije stavljanja imobilina. Pridržavajući imobilinske vrpce s jedne strane pincetom, isprala sam ih uranjajući ih

u menzuru s elektrodnim puferom. Prije upotrebe treba 100 mL matične otopine elektrodnog pufera (Tablica 12) razrijediti s reH<sub>2</sub>O do 1 L.

Tablica 11: Sastav gela za drugu dimenziju elektroforeze – 12% poliakrilamidni gel.

reH <sub>2</sub> O	21 mL
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	15 mL
30% AA/Bis	24 mL
10% SDS	600 µL
10% APS	300 µL
TEMED	25 µL

Tablica 12: Sastav matične otopine elektrodnog pufera.

Tris	30 g
Glicin	144 g
SDS	10 g
6,0 M HCl	Do pH 8,3
reH <sub>2</sub> O	Do 1 L

Nakon ispiranja, imobiline sam položila na duže staklo kalupa s gelom te ih pomoću dviju spatula smjestila na površinu gela, pazeći na orijentaciju te da između vrpce i gela nema mjehura zraka. S desne strane imobilina dodala sam još i komadić *Whatmann* filter papira površine oko 0,25 cm<sup>2</sup> natopljen s 5 µl markera (Unstained Protein MW Marker, Thermo Scientific). Fiksirala sam položaj imobilina i markera pomoću otopljene, ali ne vruće 0,5% agaroze, pripremljene otapanjem 125 mg agaroze u 25 mL elektrodnog pufera u mikrovalnoj pećnici, uz dodatak 25 µL bromfenol-plavog. Učvrstila sam po dva gela s imobilinima na držač s hlađenjem i uronila ih u kadu za elektroforezu, prekrila elektrode elektrodnom puferom i pričvrstila na izvor struje. Elektroforezu sam započela uz napon od 100 V, a nakon 45 min povisila napon na 220 V. Elektroforezu sam prekinula nakon otprilike 3 h 30 min, kad je linija bromfenol-plavog došla do ruba gela.

### 3.2.2.3.5 Vizualizacija proteinskih mrlja

Po završetku elektroforeze rastavila sam sustav te gelove ispustila u velike staklene zdjelice s oko 50 mL boje *Coomassie Brilliant Blue* (CBB; Tablica 13) kako bih vizualizirala proteinske mrlje (Balen i sur. 2011). Bojanje traje 1 h 30 min na miješalici. Nakon bojanja odlila sam CBB boju u spremnik preko lijevka. Pritom sam gel pridržavala u kutovima kako bih umanjila mogućnost zagađenja. U zdjelice sam zatim ulila otopinu za odbojavanje gelova, pripremljenu u digestoru miješanjem 20 mL 96% etanola, 20 mL octene kiseline te dopunjavanjem deH<sub>2</sub>O do 200 mL. Pored gelova smjestila sam smotuljke papirnatog ručnika koji dobro upija CBB boju i pomaže pri odbojavanju gela. Nakon otprilike 1 h na miješalici, uklonila sam papirnate ručnike, zamijenila korištenu otopinu za odbojavanje novom te ostavila gelove da se inkubiraju na miješalici preko noći. Odbojavanje je završeno kad gelovi imaju jasno vidljive proteinske mrlje na odbojanoj podlozi i tada ih treba skenirati. Nakon skeniranja gelove sam pohranila u 10% octenu kiselinu na +4 °C.

Tablica 13: Sastav boje CBB za vizualizaciju proteina.

CBB R-250	0,5 g
Metanol	250 mL
Octena kiselina	50 mL
reH <sub>2</sub> O	200 mL

### 3.2.2.4. Skeniranje gelova i usporedba ekspresijskih profila

Svaki gel sam pažljivo prenijela na čistu, nekorištenu foliju za grafoskop i postupno ga prekrila drugom takvom folijom. Zatim sam prenijela gel u folijama na čistu plohu skenera (model Epson Perfection, V700 Photo, SAD), zagladila folije i istisnula sve mjehuriće zraka i višak tekućine. Slike gelova sam obradila računalnim programom Image Master 2D Platinum. Analizirala sam proteinske mrlje koje su po postotku volumena bile barem 1,5 puta više ili manje izražene u tretmanima u odnosu na kontrolu.



### 3.2.2.5. Spektrometrija masa

#### 3.2.2.5.1. Priprema uzoraka za digestiju u gelu

Tijekom postupka pripreme uzoraka za digestiju, osim kute i rukavica nosila sam i zaštitnu kapu te po potrebi kiruršku masku kako bih uzorke što manje zagađivala keratinom. Radnu površinu i sav pribor također sam očistila alkoholom. Pripremila sam otopinu za dodatno odbojavanje gelova, miješanjem 40 mL metanola, 10 mL octene kiseline te dopunjavanjem deH<sub>2</sub>O do 100 mL i rasporedila po 1 mL te otopine u 1,5 mL tubice. Gel sam stavila na transiluminator kako bih bolje vidjela mrlje te pomoću mikropipete s nastavkom odrezanog vrha izrezala proteinske mrlje planirane za analizu, zabadajući nastavak okomito u gel. Kod većih mrlja uzimala sam po dva izreska. Izreske sam ispustila u tubice s otopinom za odbojavanje te ih inkubirala na tresilici (Thermomixer comfort, Eppendorf, Njemačka) pri sobnoj temperaturi i 350 rpm preko noći. Izreske koji su nakon inkubacije još uvijek bili plavičasti zagrijavala sam u mikrovalnoj pećnici po 2 min na opciji za odmrzavanje sve dok se nisu odbojali.

Otapanjem 79,056 g amonijevog hidrogenkarbonata (NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>) u 1 L vode pripremila sam 1 M amonijev hidrogenkarbonatni pufer pH vrijednosti 7,8. Potom sam na 5 mL tog pufera dodala deH<sub>2</sub>O do 100 mL kako bih dobila 50 mM pufer. S odbojenih izrezaka uklonila sam otopinu za odbojavanje i dodala 500 µL 50 mM pufera amonijevog hidrogenkarbonata, a zatim inkubirala 5 min na tresilici (450 rpm, sobna temperatura). Kako mikropipetom ne bih usisala i izreske gela koji su obezbojeni, sitni i u puferu gotovo nevidljivi, na plavi 1 mL nastavak mikropipete nataknila sam bijeli 20 µL nastavak. Korak ispiranja u puferu ponovila sam dva puta, uz zadnju inkubaciju trajanja 30 min. Zatim sam s izrezaka uklonila pufer te na njih dodala 500 µL otopine pufera (50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> pH 7,8) i acetonitrila volumnog omjera 1:1 i inkubirala uzorke na tresilici 30 min. Otopinu sam zatim uklonila, a izreske pokrila sa 100 µL čistog acetonitrila i inkubirala 5 min na tresilici. Dodatkom acetonitrila izresci gelova postaju bjeličasti, manji i bolje vidljivi. Zatim sam uklonila acetonitril te otvorene tubice smjestila u centrifugalnu vakuumsku sušilicu (model Concentrator 5301, Eppendorf, Njemačka; u daljnjem tekstu SpeedVac) i sušila 15-45 min pri 45 °C. Prilikom vađenja uzoraka iz SpeedVac-a potrebno je odmah zatvoriti tubice jer su suhi izresci gela sitni i lepršavi te lako izlete iz tubice.

#### 3.2.2.5.2. Digestija uzoraka u gelu pomoću tripsina

Pripremila sam 2 mL otopine tripsina masene koncentracije 10 µg/mL u 25 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> puferu. Taj sam pufer pripremila razrjeđenjem prethodno korištenog 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> pufera pH 7,8 s reH<sub>2</sub>O u omjeru 1:1. Otopinu tripsina koncentracije 10 µg/mL pripremila sam uzevši 20 µL matične otopine tripsina koncentracije 1mg/mL i 1980 µL 25 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> pufera. Tu sam otopinu koristila za digestiju proteina u gelu. Najprije sam pipetom uzela 10 µL otopine tripsina, a zatim posegnula za suhim izreskom gela, koji bi se zalijepio na vlažan vrh nastavka pipete, te ga tako premjestila u novu, malu tubicu (200 µL), ispuštajući pritom otopinu tripsina. Tubice sam centrifugirala desetak sekundi (model MiniSpin, Eppendorf, Njemačka) kako bi se sav volumen pufera s tripsinom spustio na dno tubice i prekrrio izreske gela. Uzorke sam inkubirala na tresilici pri 37°C (optimalna temperatura za rad tripsina) i 400 rpm tijekom 18 h.

#### 3.2.2.5.3. Ekstrakcija peptida iz gela

Nakon digestije, premjestila sam uzorke s peptidima iz tubica u jažice mikrotitarske pločice s 96 jažica sa suženim dnom (*96 well Eppendorf plate*). Pločicu sam sušila 30 min pri 45 °C u SpeedVac-u kako bi se uzorci uparili, a za to vrijeme ekstrahirala preostale peptide iz izrezaka gela koji su ostali u tubicama. Za ekstrakcijsku otopinu prvo sam pripremila 1 mL 5% trifluoroctene kiseline (TFA), stavivši 50 µL TFA u 950 µL reH<sub>2</sub>O, a zatim je pomiješala s 1 mL acetonitrila. Dodala sam po 10 µL ekstrakcijske otopine na gelove. Tubice s gelovima sam zatim stavila u nosač od spužve te sonicirala u ultrazvučnoj kupelji (model Ultrasonic Cell Disruptor XL, Misonix Inc., SAD) kroz 30 min. Zatim sam ih inkubirala 15 min na tresilici (Thermomixer comfort, Eppendorf, Njemačka) pri 400 rpm. Naposljetku sam otopine s ekstrahiranim peptidima prebacila u istu mikrotitarsku pločicu, pazeći da svaki uzorak stavim u istu jažicu u koju sam stavila i prvi dio uzorka. Uzorke sam opet uparavala 30 min pri 45 °C u SpeedVac-u. Upareni peptidi mogu se čuvati na -85 °C.

#### 3.2.2.5.4. Pročišćavanje peptida

Za pročišćavanje peptida koristila sam automatizirani uređaj (model AssayMAP Bravo Automated Liquid Handling Platform, Agilent Technologies, SAD) koji koristi kromatografske kolone. AssayMAP tehnologija ima 96-kanalnu robotsku ruku opremljenu s preciznim protočnim špicama na koje se spajaju nastavci s kromatografskim kolonama. Postupak pročišćavanja peptida temelji se na principu tekućinske kromatografije obrnutih faza (RP-S).

Kolona se kondicionira nizom otapala rastuće polarnosti. Na kondicioniranu kolonu se nanosi uzorak te se peptidi elektrostatskim interakcijama vežu za punilo kolone. Polarnije molekule i ioni zaostali iz pufera imaju slabiji afinitet za kolonu te se ispiru polarnim otapalom, vodenom otopinom TFA. Peptidi su manje polarni pa se ispiru vodenom otopinom acetonitrila, koja je manje polarna.

Osušenim peptidima u mikrotitarskoj pločici dodala sam 45  $\mu\text{L}$  0,1% TFA. Pripremila sam otopine (Tablica 14) za kondicioniranje kolone (pripremni i ekvibracijski pufer) i eluciju, odnosno ispiranje peptida s kolone (elucijski pufer) te ih otpipetirala u plastične nosače (*12 column low profile polypropylene reservoirs*). Pločicu s uzorcima, nosače s otopinama te prazne nosače za skupljanje organskog otapala i praznu pločicu za prikupljanje eluata s pročišćenim peptidima postavila sam u AssayMAP instrument na za njih predviđena mjesta. Program pročišćavanja peptida je trajao 90 minuta. RP-S kolone su prvo kondicionirane sa 100  $\mu\text{L}$  pripremnog pufera brzinom od 300  $\mu\text{L}/\text{min}$ , a potom sa 100  $\mu\text{L}$  ekvibracijskog pufera brzinom od 10  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Potom je uslijedilo nanošenje uzorka brzinom od 5  $\mu\text{L}/\text{min}$  te elucija peptida u volumenu od 25  $\mu\text{L}$  brzinom od 3  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Tako dobiveni pročišćeni uzorci osušeni su u SpeedVac-u te su svježije pripremljeni korišteni za daljnju analizu.

Tablica 14: Priprema otopina za pročišćavanje peptida pomoću instrumenta AssayMAP.

Pripremni pufer	
Acetonitril	25 mL
TFA	50 $\mu\text{L}$
reH <sub>2</sub> O	50 mL
Ekvibracijski pufer	
TFA	50 $\mu\text{L}$
reH <sub>2</sub> O	50 mL
Elucijski pufer	
Acetonitril	35 mL
TFA	50 $\mu\text{L}$
reH <sub>2</sub> O	15 mL

### 3.2.2.5.5. Analiza peptida spektrometrom masa

Na pročišćene i osušene peptide u mikrotitarskoj pločici nakapala sam po 3  $\mu$ L svježe pripremljene matrice ( $\alpha$ -cijano-4-hidroksicimetna kiselina (CHCA), koncentracije 5 mg/mL, otopljena u smjesi acetonitrila i 0,1% TFA u omjeru 1:1). Pomiješala sam uzorke s matricom te ih nakapala na pločicu za MALDI u dvije replike. Uzorak treba ispustiti okomito na pločicu, u volumenu 1 – 1,5  $\mu$ L, tako da kapljica prekrije kružić predviđen za uzorak, ali da se preko njega ne prelije. Uzorci se tijekom nekoliko minuta na zraku osuše te je pločica tada spremna za analizu.

Osušenu pločicu stavila sam u komoru instrumenta 4800 Plus analyzer, Applied Biosystems, SAD, za analizu MALDI-TOF/TOF. Parametri analize prikazani su u Tablici 15. Za internu kalibraciju spektra masa koristila sam signale peptida nastalih autolizom tripsina. Interna kalibracija odvija se tijekom samog snimanja spektra pomoću računalnog programa koji je vezan uz instrument i točnija je od vanjske kalibracije. Nakon snimanja spektara MS, odabire se deset peptida prekursora s najintenzivnijim signalima te se oni podvrgnu daljnjoj fragmentaciji unutar instrumenta, kako bi se dobio spektar MS/MS.

Tablica 15: Parametri analize MALDI-TOF/TOF.

Tip analize	MS	MS/MS
Detekcija iona	pozitivna	pozitivna
Zrcalo	reflektron	reflektron
Broj snimaka/spektara	80	120
Raspon masa [Da]	900-4000	900-4000
Brzina snimanja [Hz]	200	200
Kolizijski plin	Uključen	Uključen

### 3.2.2.5.6. Identifikacija proteina pretraživanjem baza podataka NCBIInr i UniProt

Dobivene spektre masa MS/MS koristila sam za daljnju pretragu spektralne baze podataka NCBIInr/green plants pomoću specijaliziranog računalnog programa MASCOT (verzija 2.1.,

Matrix Science, UK). Monoizotopne mase peptida korištene su za MS i MS/MS pretraživanje baze podataka sa slijedećim parametrima pretrage: MS/MS tolerancija mase fragmenta 0,5 Da, tolerancija mase prekursora 0,3 Da, maksimalni broj propuštenih cijepanja 1, te naboj peptida +1. Iz dobivenih spektara MS/MS iščitava se slijed aminokiselina fragmentiranih peptida na temelju razlike u masama između pojedinih signala spektra. Fragmentirane peptide posebni algoritmi računalnog programa (Protein pilot) vezanog uz instrument MALDI-TOF/TOF preklapaju i slažu u cjelinu. Iz iščitano aminokiselinskog slijeda uz pomoć alata MASCOT identificira se protein kojem pripada ta sekvenca, uspoređivanjem izmjerenih masa signala dobivenih spektara (uzoraka) s teoretski izračunatim masama peptida pohranjenim u bazama podataka. Za svaki identificirani protein iz vrste *N. tabacum* ili pronađeni homologni protein iz druge biljne vrste pronašla sam pomoću baze podataka UniProt biološku kategoriju u kojoj protein djeluje. Proteine sam kategorizirala prema zajedničkim biološkim kategorijama, odnosno biološkim procesima. Za izradu grafičkih prikaza koristila sam program Microsoft Office Excel 2016.

### 3.2.3. Fotosinteza

#### 3.2.3.1. Određivanje koncentracije fotosintetskih pigmenata

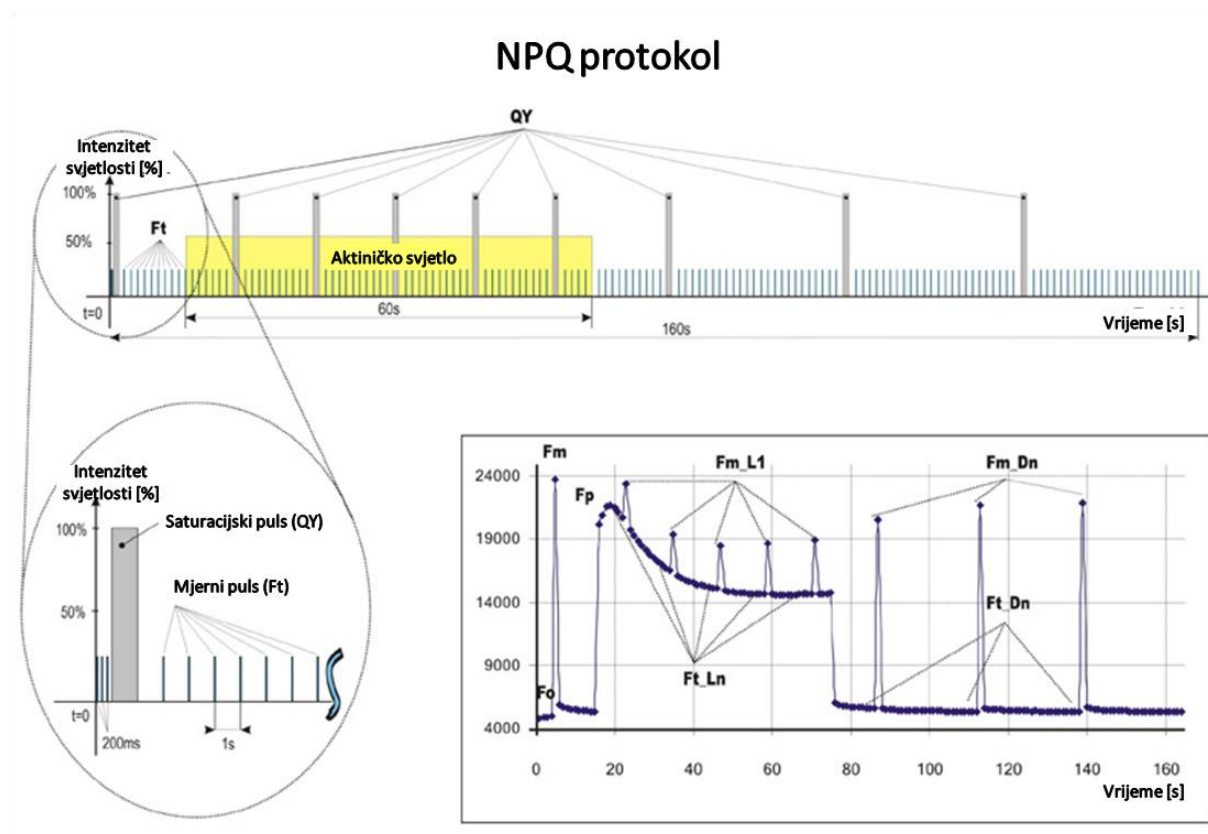
Koncentraciju fotosintetskih pigmenata mjerila sam metodom po Lichtenhalteru (1987), koja omogućava određivanje koncentracije klorofila *a* ( $C_a$ ), klorofila *b* ( $C_b$ ) i ukupnih karotenoida ( $C_{x+c}$ ) u istom ekstraktu (Lichtenhalter i Buschman 2001). Odvagala sam po 0,25 g cijelih klijanaca u *Falcon* tube s poklopcem te ih prelila s 3 mL 100% acetona. Od svakog tretmana priredila sam po 5 replika. Uzorke sam inkubirala u tami 4 dana. Apsorbanciju sam mjerila pomoću spektrofotometra (model UV/VIS, Unicam, Engleska) pri valnim duljinama 470 nm, 644,8 nm i 661,6 nm. Koristila sam 1,5 mL kvarcne kivete. Kao slijepu probu koristila sam 100% aceton. Koncentracije fotosintetskih pigmenata izračunala sam iz apsorbancija prema formulama:  $C_a = 11,24 \times A_{661,6} - 2,04 \times A_{644,8}$ ;  $C_b = 20,13 \times A_{644,8} - 4,19 \times A_{661,6}$ ;  $C_{x+c} = (1000 \times A_{470} - 1,90 \times C_a - 63,14 \times C_b) / 214$ . Podatke sam statistički obradila u programu Statistica13.1 koristeći Duncanov post-hoc test ANOVA uz prag značajnosti  $p < 0,05$ . Za izradu grafičkog prikaza koristila sam program Microsoft Office Excel 2016.

#### 3.2.3.2. Mjerenje fluorescencije klorofila

Fluorescenciju klorofila mjerila sam prateći upute iz priručnika za korištenje uređaja Fluorpen FP 100 serije, Photon Systems Instruments, Češka (2014). Za mjerenje fluorescencije klorofila

koristila sam izdvojene kotiledone klijanaca. Zbog njihove male veličine morala sam prilagoditi metodu i posložiti više kotiledona jedne do drugih da zajedno čine dovoljno veliku površinu za mjerenje. Kao podlogu za kotiledone pripremila sam komadiće *Whatman No. 1* filter-papira veličine oko 4 cm<sup>2</sup>. Papiriće sam navlažila destiliranom vodom, kako se kotiledoni na njima ne bi osušili. Pomoću skalpela odrezala sam pojedinačne kotiledone u području peteljke, pazeći da ne oštetim plojku lista. Posložila sam ih jedne do drugih na filter papir licem prema gore, tako da se ne preklapaju, da između njih bude što manje praznina i da prekrivaju površinu kruga promjera većeg od 6,5 mm, koliki je promjer otvora štipaljke fluorometra. Tako pripremljene kotiledone inkubirala sam u mraku (zatvorena ladica u zamračenoj prostoriji) 30-45 min. Od svakog tretmana pripremila sam 5 replika.

Fluorescenciju klorofila mjerila sam u zamračenoj prostoriji pomoću fluorometra (model uređaja Fluorpen FP 100, Photon Systems Instruments, Češka) metodom NPQ1 (Slika 3) s postavkama intenziteta aktiničkog svjetla A-pulse = 10% (100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), saturacijskog pulsa F-pulse = 70% (2100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) i mjernog pulsa f-pulse = 30% (900  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Kao važne parametre odabrala sam temeljnu ( $F_0$ ) i maksimalnu ( $F_m$ ) fluorescenciju, fluorescenciju po uključanju aktiničke svjetlosti ( $F_p$ ), maksimalni kvantni prinos PSII ( $QY_{\text{max}}$ ), efektivni kvantni prinos PSII  $QY_{\text{Lss}}$  pri ustaljenom stanju tijekom osvjetljenja (eng. *Light steady state*, Lss),  $NPQ_{\text{Lss}}$  i  $qP_{\text{Lss}}$  u istom trenutku te  $NPQ_{\text{D3}}$  i  $qP_{\text{D3}}$  pri zadnjem mjerenju u uvjetima mraka. Podatke sam statistički obradila u programu Statistica13.1 koristeći Duncanov post-hoc test ANOVA uz prag značajnosti  $p < 0,05$ .

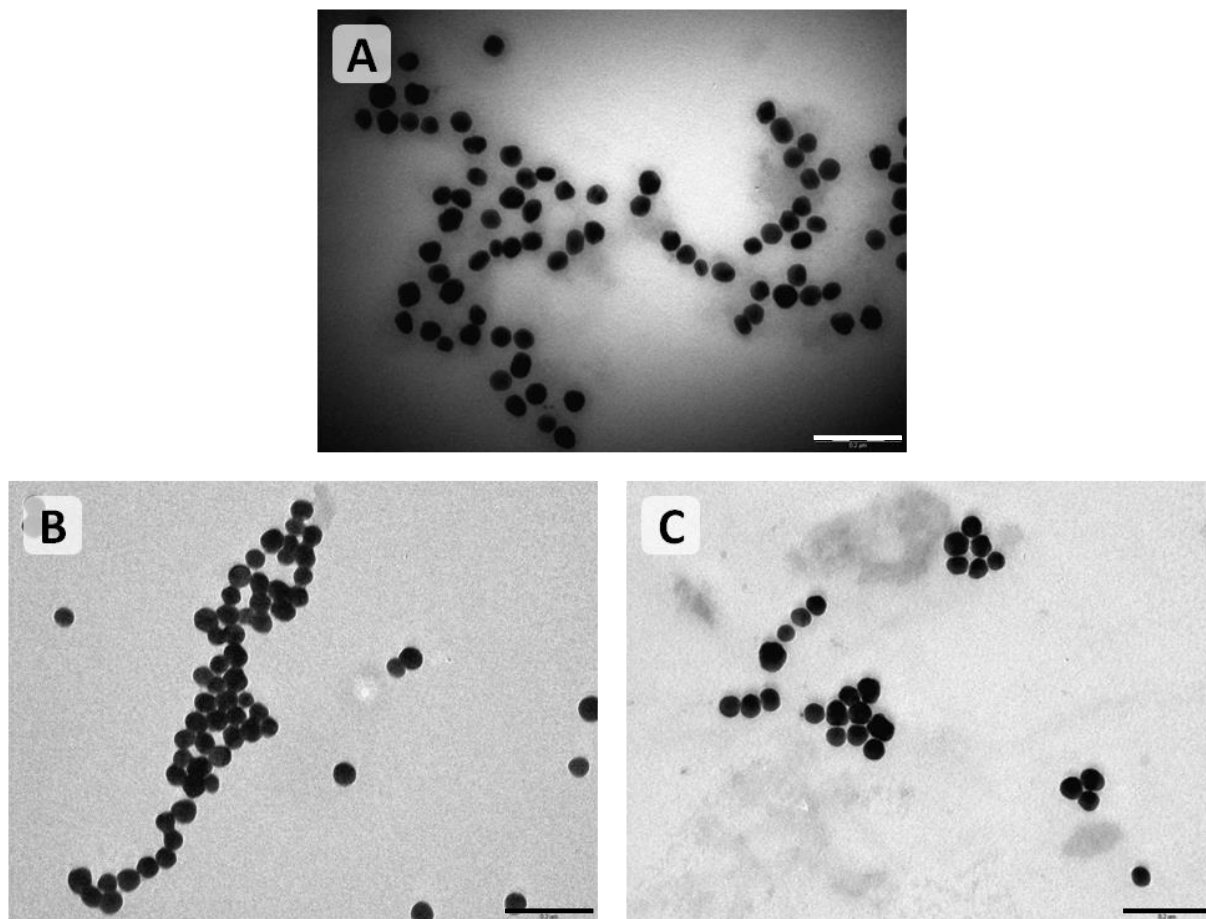


Slika 3: Grafički prikaz protokola NPQ1. Preuzeto s web stranice proizvođača i prilagođeno <<http://www.psi.cz/products/pocket-sized-instruments/fluorpen-fp-100>>

## 4. Rezultati

### 4.1. Vizualizacija nanočestica srebra

Nanočestice srebra korištene u ovom eksperimentu su sferične i ujednačene veličine od oko 50 nm, što se vidi na TEM snimkama (Slika 4). Pojavljuju se pojedinačno ili u nakupinama.



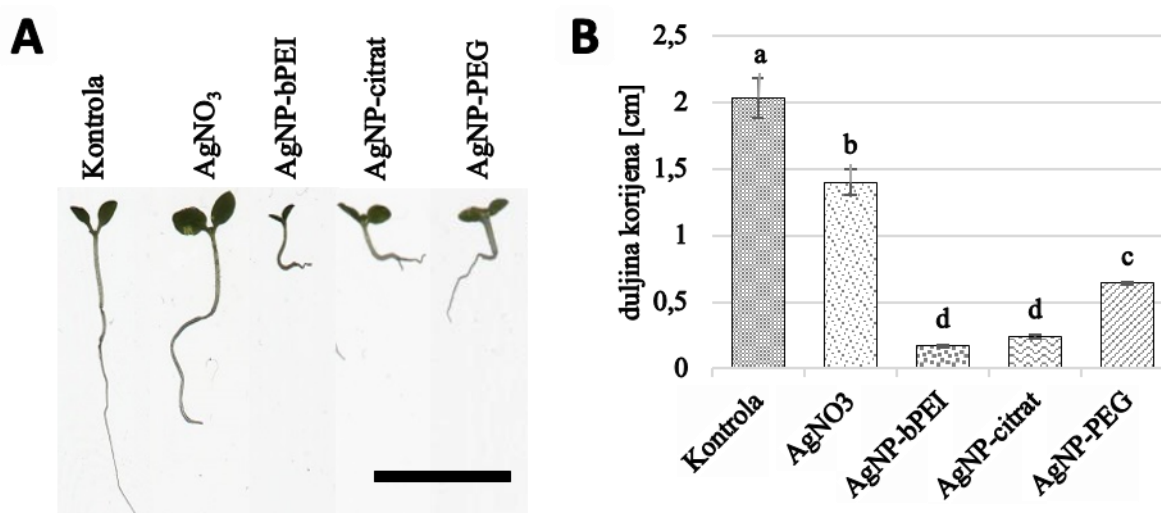
Slika 4: Nanočestice srebra pod transmisijским elektronskim mikroskopom. (A) AgNP-bPEI (B) AgNP-citrat (C) AgNP-PEG. Mjerilo prikazuje 0,2 μm.

### 4.2. Morfometrija korijena klijanaca duhana

Klijanci duhana tretirani su nanočesticama srebra (AgNP), koje su stabilizirane s tri različita omotača (AgNP-citrat, AgNP-PEG i AgNP-bPEI), te ionskim srebrom ( $\text{AgNO}_3$ ). Sjemenke su klijale u  $\frac{1}{2}$ MS mediju (sa ili bez prisutnosti srebra) te su se iz njih razvili klijanci koji su nastavili rasti u istom mediju tijekom 10 dana. Fotografije duhana desetog dana nakon početka isključivanja prikazane su na Slici 5, kao i duljine korijena klijanaca. Klijanci tretirani AgNP izgledaju sitno, dok oni tretirani ionskim srebrom veličinom sliče kontroli. Ipak, svi tretirani klijanci imaju u usporedbi s kontrolom značajno kraći korijen. Korijeni klijanaca tretiranih



ionskim srebrom značajno su kraći od korijena kontrole, a korijeni tretirani svim vrstama AgNP značajno su kraći od tretmana ionima srebra. Među različitim AgNP postoji razlika: korijeni tretirani AgNP-PEG značajno su duži od korijena tretiranih AgNP-citrat i AgNP-bPEI, koji su međusobno slični i čak deset puta kraći od korijena kontrole.

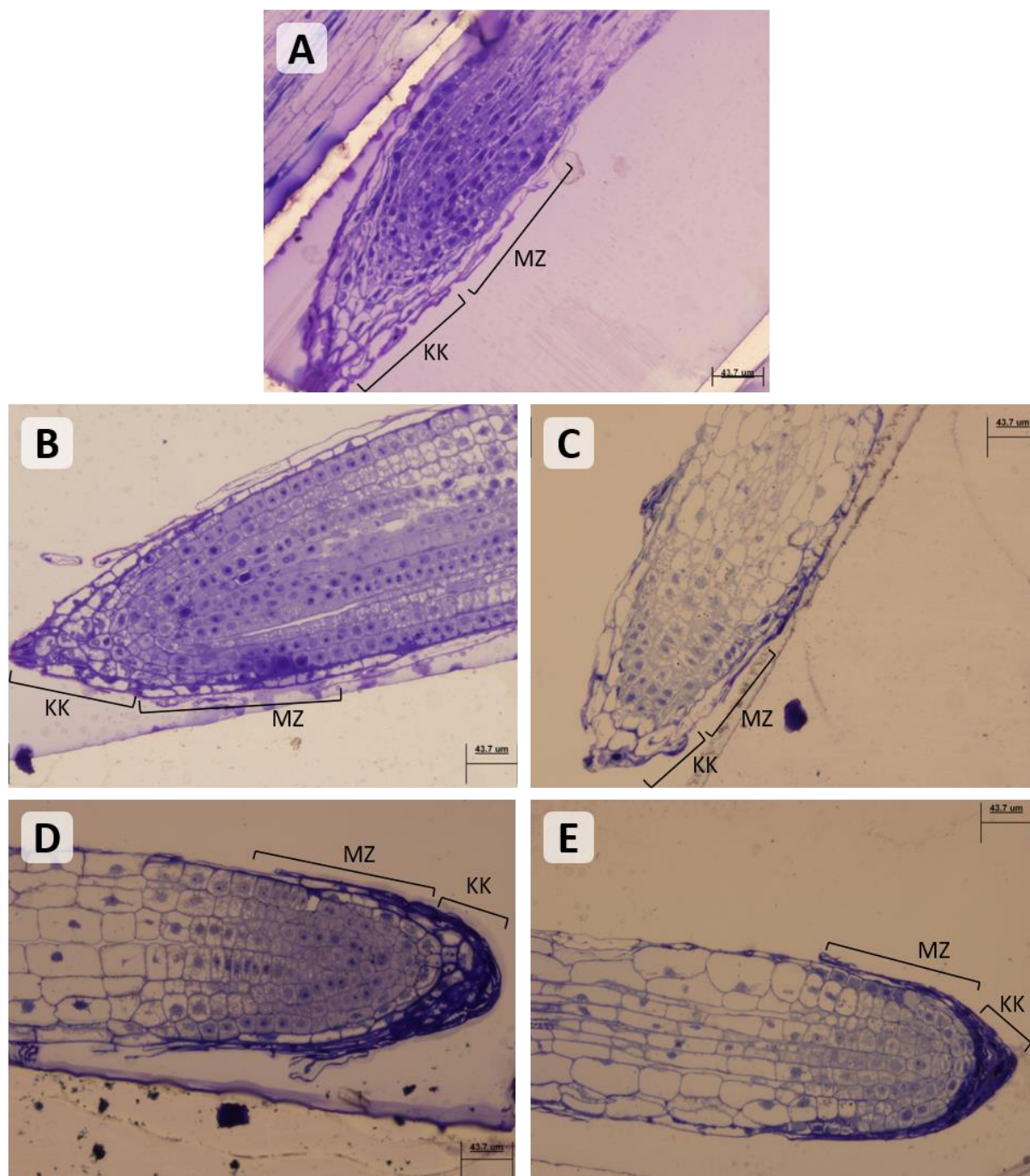


Slika 5: Klijanci duhana desetog dana nakon početka isključivanja. (A) Reprezentativni primjerci iz kontrolne skupine te svake od testnih skupina tretiranih 100  $\mu$ M ionskim srebrom (AgNO<sub>3</sub>) te 100  $\mu$ M nanočesticama srebra (AgNP-bPEI, AgNP-citrat, AgNP-PEG). Mjerilo prikazuje 1 cm. (B) Duljine korijena klijanaca duhana. Različita slova označavaju statistički značajne razlike (Duncan test,  $p < 0,05$ ).

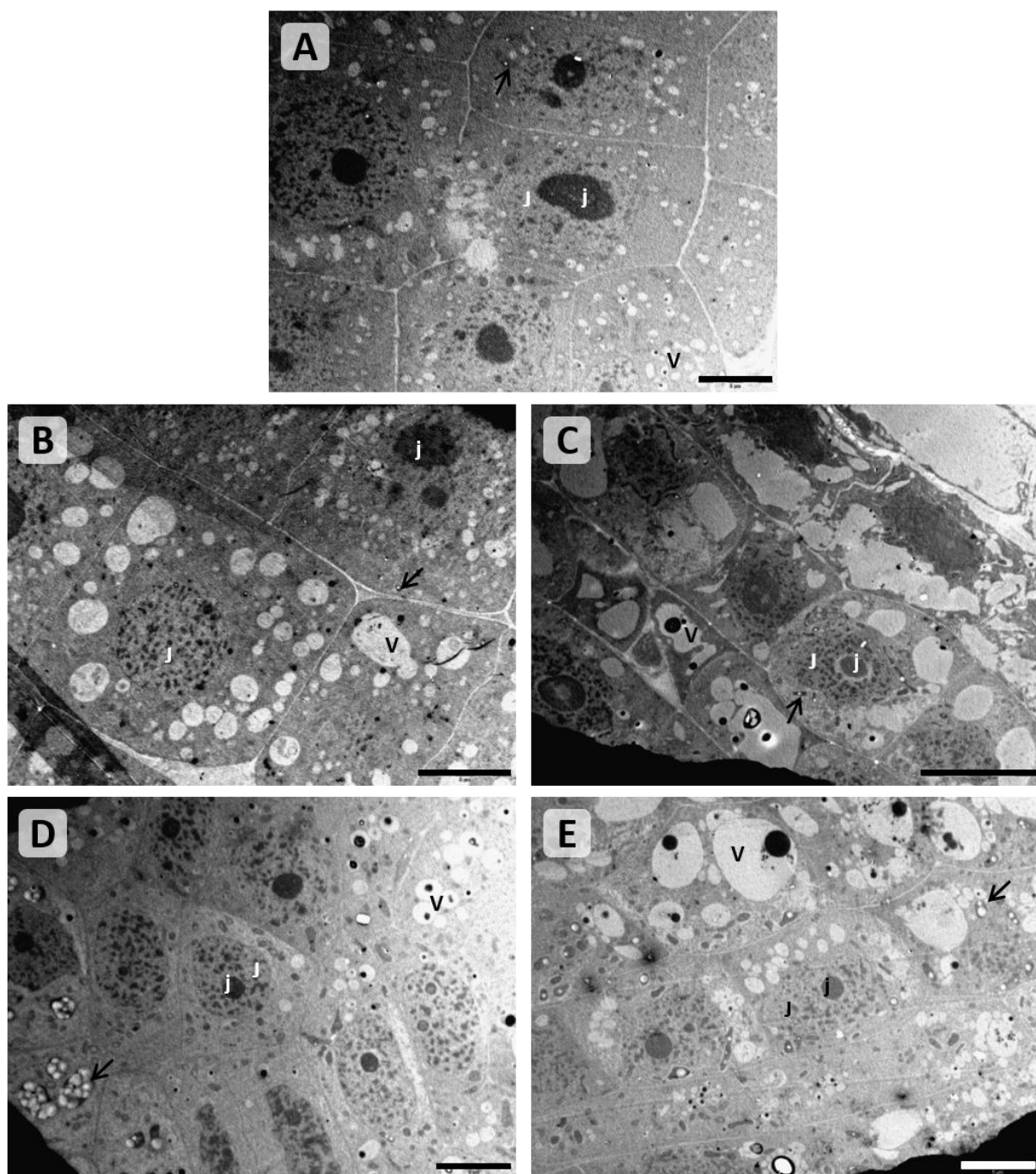
#### 4.3. Mikroskopija

Na uzdužnim prerezima korijena klijanaca duhana tretiranih nanočesticama i ionima srebra uočljive su morfološke promjene u usporedbi s kontrolom (Slika 6). U korijenima tretiranima s AgNP prisutna su veća oštećenja nego u onima tretiranima ionima srebra. Korjenova kapa reducirana je kod svih tretmana, premda u tretmanu ionima srebra nešto manje nego u tretmanima s AgNP. Stanice korijena tretiranih klijanaca veće su nego kod kontrole. Zona meristema je reducirana u korijenima klijanaca tretiranih AgNP, a u korijenu tretiranom ionima srebra djeluje veće nego u kontroli i tretmanima AgNP. Na prerezima korijena snimljenim TEM-om nije uočljiva razlika u ultrastrukturi (Slika 7). U stanicama meristema vidljive su velike jezgre s jezgricama, amiloplasti sa škrobom i mnoštvo malih vakuola, koje u mnogim slučajevima sadrže izrazito kontrastne nakupine sekundarnih metabolita.

Na poprečnim prerezima kotiledona klijanaca duhana tretiranih nanočesticama i ionima srebra nisu uočljive značajne morfološke promjene (Slika 8). Kotiledoni imaju pravilnu adaksijalno-abaksijalnu polarnost te sadrže provodna tkiva. Kloroplasti su lako uočljivi u parenhimskim stanicama, osim u slučaju tretmana s AgNP-bPEI, gdje su prisutni, ali tanji i stoga slabije uočljivi. Na TEM-snimkama kloroplasta (Slika 9) vidi se da su kloroplasti uglavnom ovalnog ili blago vretenastog oblika kod netretiranih klijanaca i većine tretmana. Odstupaju kloroplasti klijanaca tretiranih AgNP-bPEI, koji su izrazito izduženi. U svim kloroplastima jasno je vidljiv tilakoidni sustav. On je u kloroplastima netretiranih klijanaca rahlo raspoređen i jasno se vide grana i stroma tilakoidi, a u kloroplastima svih tretmana raspoređen je gušće, često je stiješnjen između škrobnih zrnaca i djeluje neurednije, pogotovo u slučaju AgNP-bPEI. Dok su škrobna zrnca u kloroplastima kontrole rijetko prisutna, razlike u količini i veličini škrobnih zrnaca primjetne su među tretmanima. Kloroplasti klijanaca tretiranih AgNP-citrat imaju najviše škrobnih zrnaca te su ona često i veća. Kloroplasti tretirani ionskim srebrom i AgNP-bPEI također imaju mnogo škrobnih zrnaca, a kloroplasti iz AgNP-PEG tretiranih klijanaca sadrže vrlo malo škrobnih zrnaca u usporedbi s ostalim tretmanima. U svim kloroplastima uočljivi su plastoglobuli, ali su u tretmanu ionskim srebrom veći i ima ih više.

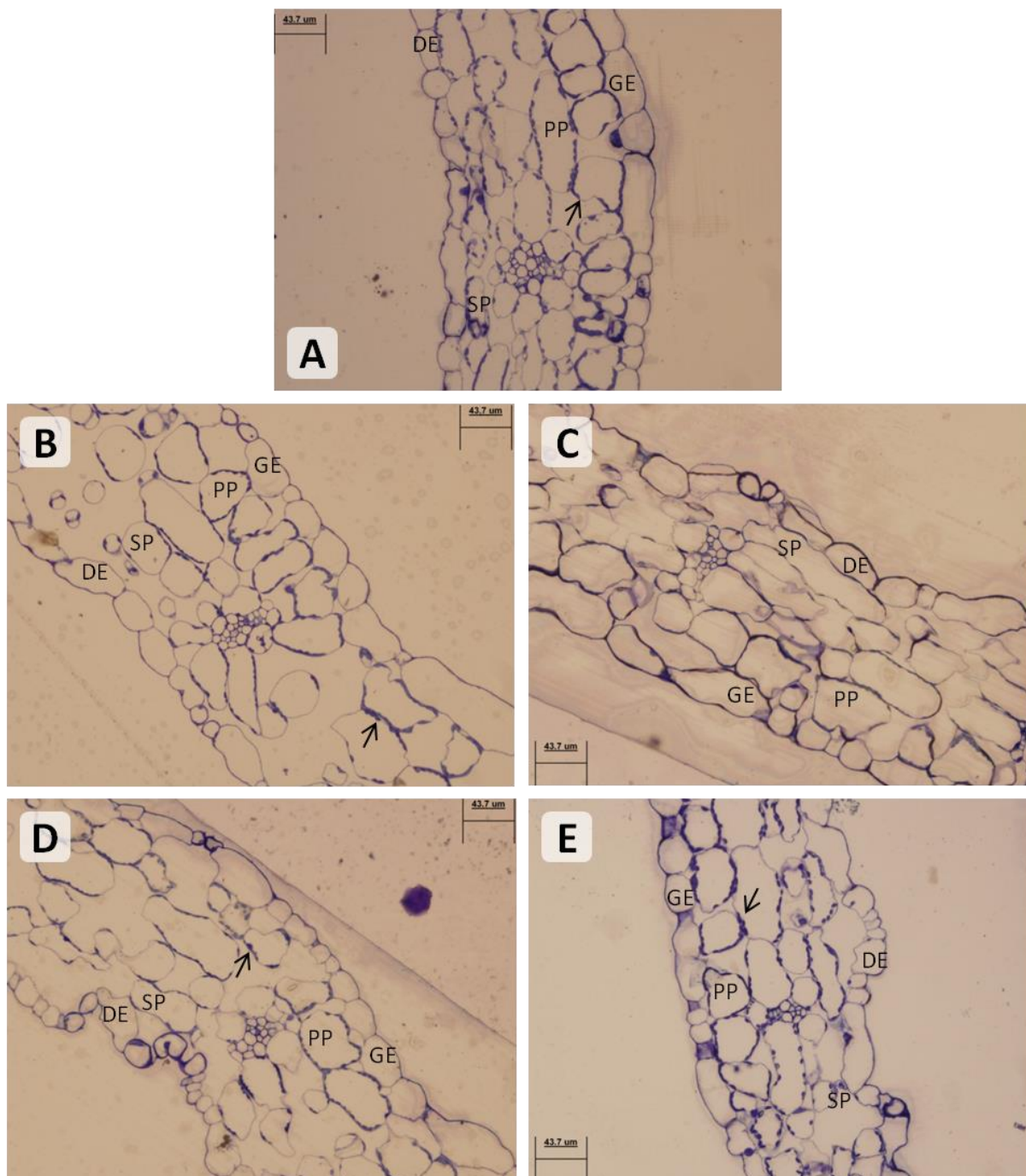


Slika 6: Uzdužni prerezi korijenovog vrška klijanaca duhana pod svjetlosnim mikroskopom. (A) Kontrolna skupina, (B-E) tretirane skupine: (B)  $\text{AgNO}_3$ , (C)  $\text{AgNP-bPEI}$ , (D)  $\text{AgNP-citrat}$ , (E)  $\text{AgNP-PEG}$ . Označena je kolumela korijenove kape (KK) i meristemska zona (MZ). Mjerilo prikazuje  $43,7 \mu\text{m}$ .

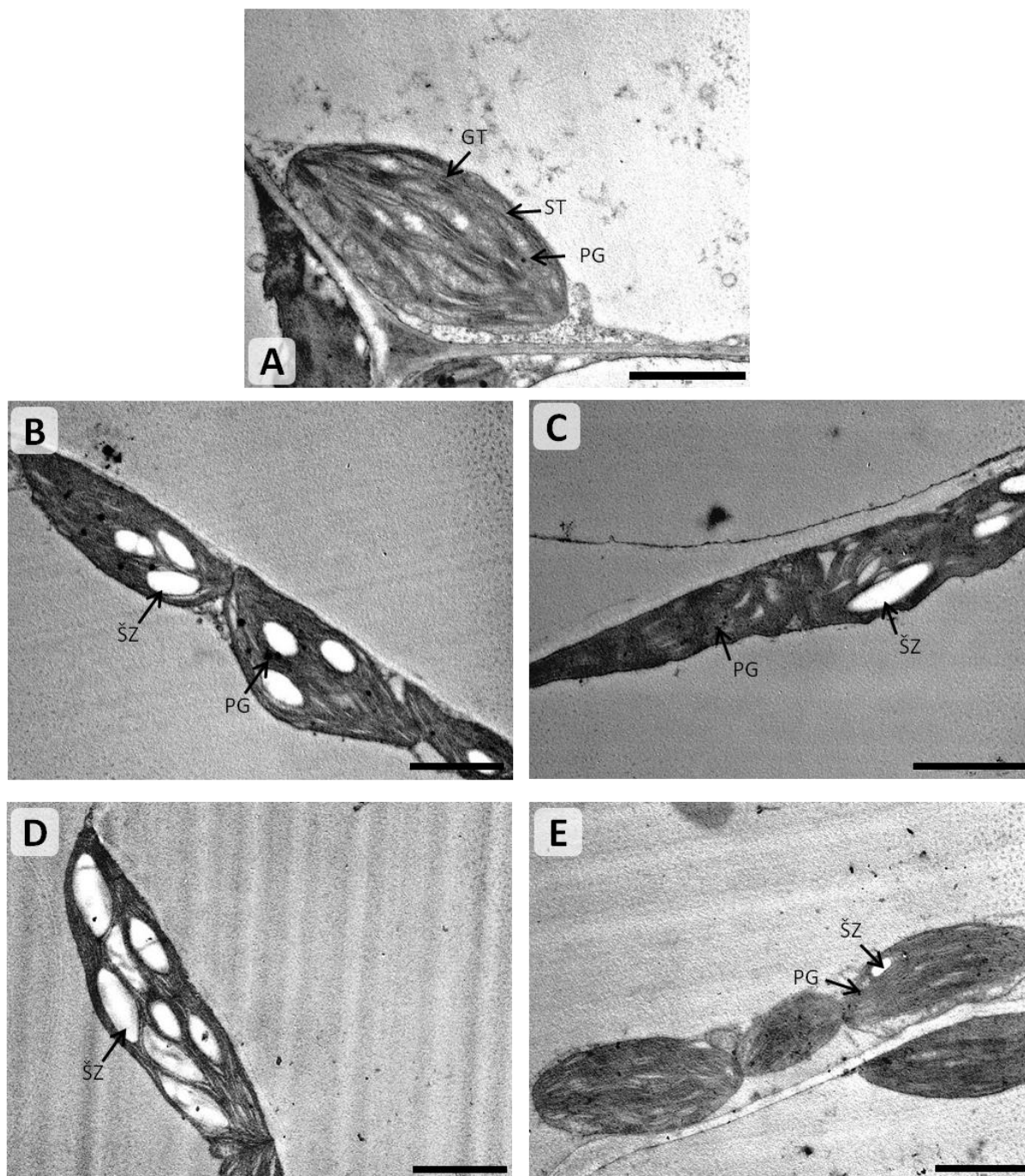


Slika 7: Prerezi korijenovog vrška klijanaca duhana pod transmisijskim elektronskim mikroskopom. (A) Kontrolna skupina, (B-E) tretirane skupine: (B) AgNO<sub>3</sub>, (C) AgNP-bPEI, (D) AgNP-citrat, (E) AgNP-PEG. Označene su jezgre (J), jezgrice (j), vakuole (V) i amiloplasti (strelica). Mjerilo prikazuje 5 μm (A, B, D, E) ili 10 μm (C).





Slika 8: Prerezi kotiledona klijanaca duhana pod svjetlosnim mikroskopom. (A) Kontrolna skupina, (B-E) tretirane skupine: (B)  $\text{AgNO}_3$ , (C) AgNP-bPEI, (D) AgNP-citrat, (E) AgNP-PEG. Strelice pokazuju primjer kloroplasta. Slovne oznake označavaju gornju epidermu (GE), palisadni parenhim (PP), spužvasti parenhim (SP) i donju epidermu (DE). Mjerilo prikazuje 43,7  $\mu\text{m}$ .

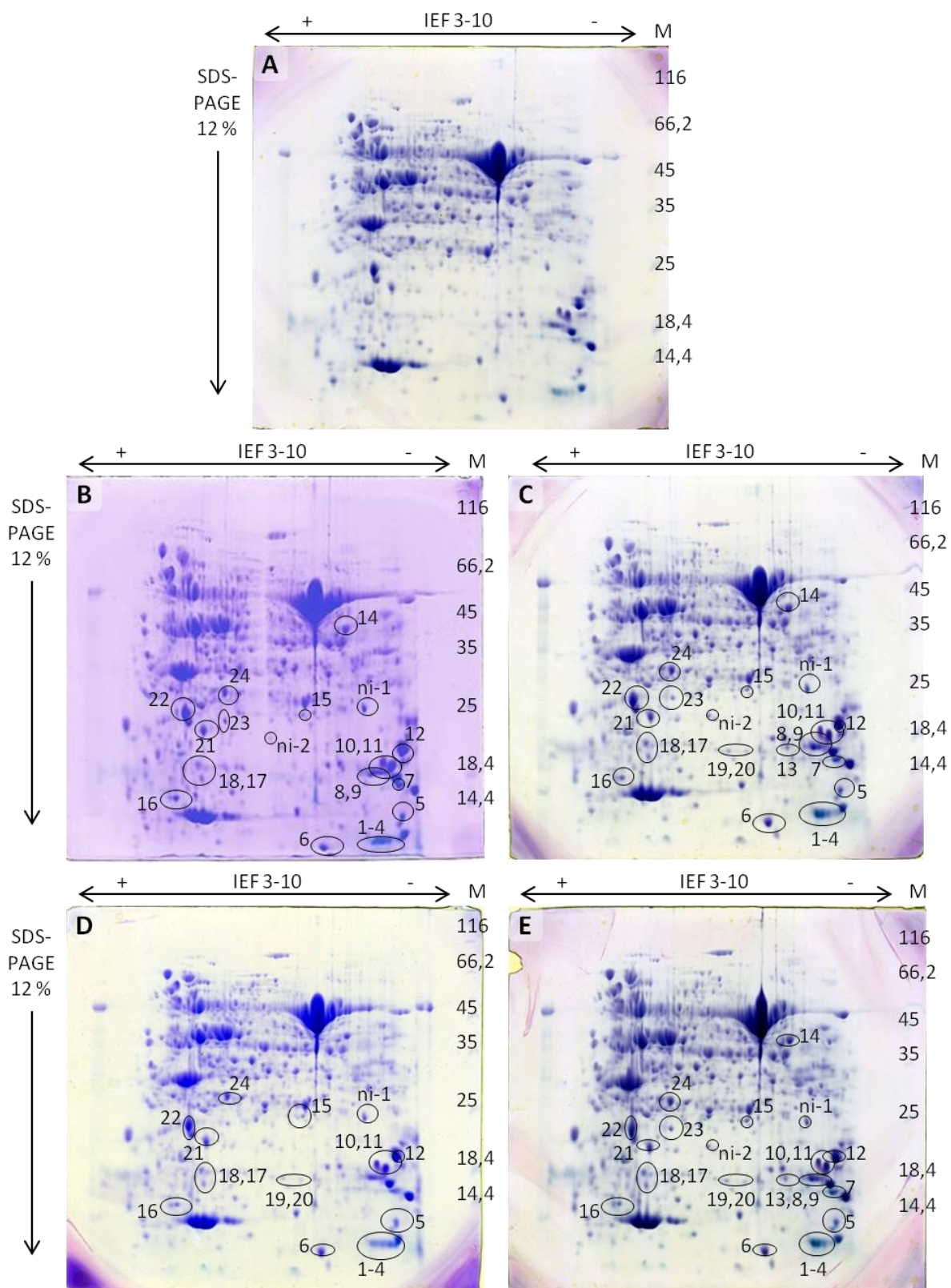


Slika 9: Kloroplasti klijanaca duhana pod transmisijским elektronskim mikroskopom. (A) Kontrolna skupina, (B-E) tretirane skupine: (B)  $\text{AgNO}_3$ , (C) AgNP-bPEI, (D) AgNP-citrat, (E) AgNP-PEG. Slozne oznake označavaju škrobna zrnca (SZ), plastoglobule (PG), grana-tilakoide (GT) i stroma-tilakoide (ST). Mjerilo prikazuje 2  $\mu\text{m}$ .

#### 4.4. Proteomika

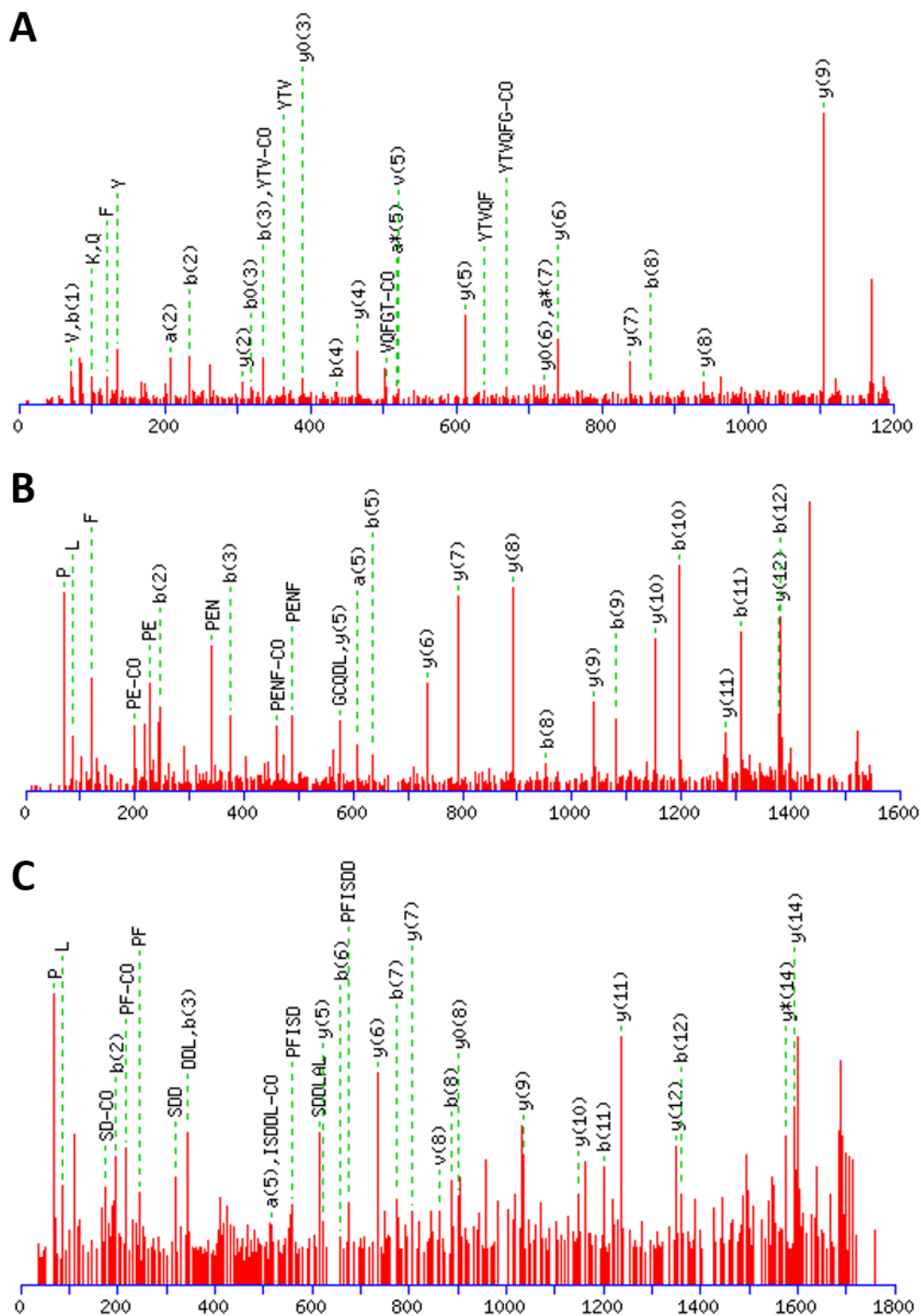
Na slikama 2-DE gelova vidljivo je mnogo proteinskih mrlja i profil ekspresije u svim tretmanima i kontroli općenito izgleda jako slično (Slika 10). Ipak postoji razlika u intenzitetu određenih mrlja, njih 26. Te mrlje su analizirane spektrometrijom masa. Primjer rezultata MASCOT pretrage dan je u Prilogu 2 za mrlju 1, a tipični MS/MS spektri prikazani su na Slici 11 za tri peptida iz iste mrlje. Prema spektrima je određena bodovna vrijednost (eng. *score*) te je identificiran protein „Podjedinica reakcijskog centra fotosustava I“. U Tablici 16 dan je pregled proteina po mrljama te razlikovna ekspresija u usporedbi s kontrolom. Od 26 analiziranih mrlja u 24 mrlje su proteini uspješno identificirani, a za dvije mrlje identifikacija nije uspjela (mrlje ni-1 i ni-2). U dva slučaja isti je protein identificiran u više mrlja, i to podjedinica reakcijskog centra fotosustava I u mrljama 1-4 i PsbQ u mrljama 8 i 9. U mrlji 24 identificirana su dva proteina, oba tipovi askorbat peroksidaze. Svi proteini pokazuju pojačanu ekspresiju u usporedbi s kontrolom, osim glicinom bogatog RNA-veznog proteina (mrlja 16), koji je u tretmanima nanočestica slabije eksprimiran nego u kontroli, a u tretmanu ionskim srebrom ima pojačanu ekspresiju, i neidentificiranog proteina ni-2 kod kojeg je slučaj obrnut. Mrlja 13 (protein CBSX) u tretmanu ionima srebra nije detektirana.

Po funkciji gotovo dvije trećine proteina koji reagiraju na tretmane srebrom otpadaju na proteine vezane uz fotosintezu (Slika 12). Slijede proteini s ulogom u odgovoru na stres, koji čine otprilike jednu petinu identificiranih proteina. Protein PrxQ (mrlja 7) svrstan je u obje ove kategorije. Identificiran je po jedan primjerak proteina s ulogama u metabolizmu, transportu, regulaciji transkripcije, popravku nakon replikacije i vezanju nukleotida. U tretmanima AgNP-bPEI i AgNP-PEG identificirano je najviše proteina i ovi tretmani utječu na ekspresiju svih identificiranih proteina. Za razliku od njih, tretmani ionima i AgNP-citrat nisu pokazali učinak na neke od proteina. U tretmanu AgNP-citrat identificirano je najmanje proteina s razlikom u ekspresiji (18) – manje proteina s funkcijom u fotosintezi i odgovoru na stres mijenja ekspresiju pod utjecajem AgNP-citrat, a izostaje protein s funkcijom u metabolizmu (mrlja 14). U tretmanu ionima srebra izostaje promjena ekspresije proteina s funkcijom u popravku (mrlja 20).



Slika 10: Ukupni topivi proteini klijanaca duhana razdvojeni denaturirajućom 2-D elektroforezom u poliakrilamidnom gelu. (A) klijanci kontrole i (B-E) tretiranih klijanaca: (B)  $\text{AgNO}_3$ , (C)  $\text{AgNP-bPEI}$ , (D)  $\text{AgNP-citrat}$  i (E)  $\text{AgNP-PEG}$ . Označene su mrlje koje imaju različit intenzitet u odnosu na kontrolu te su izrezane za analizu spektrometrijom masa.





Slika 11: Primjeri spektara MS/MS prema kojima je dobiven *score* i identificiran protein „Podjedinica reakcijskog centra fotosustava I“ za mrlju broj 1. (A) peptid FPENFTGCQDLAK+ Carbamidomethyl (C), (B) peptid AYTQVQFGTCK + Carbamidomethyl (C) i (C) peptid VPFISDDLALCEGK+ Carbamidomethyl (C).

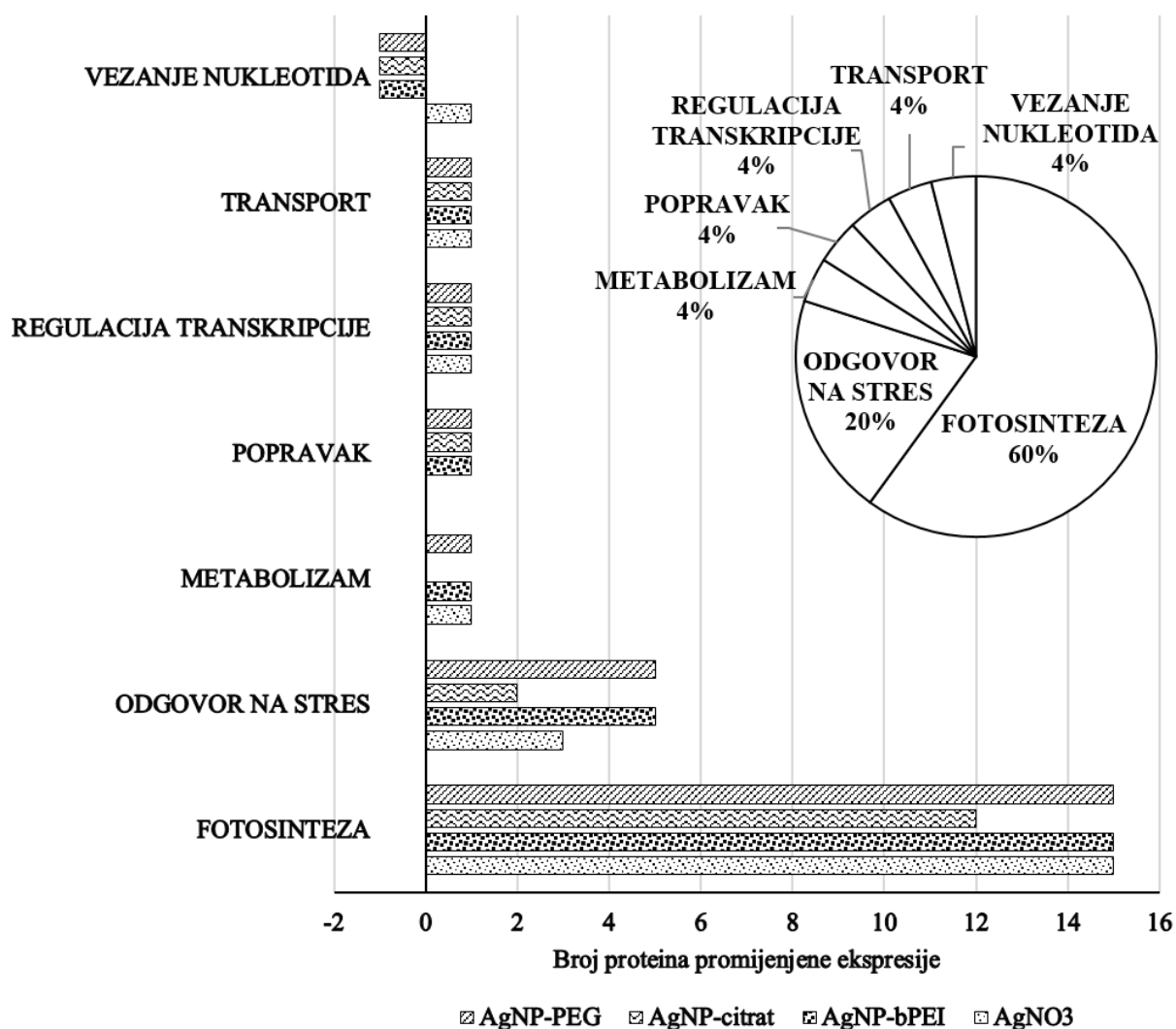
Tablica 16: Proteini identificirani pomoću metode MALDI TOF/TOF MS/MS. Navedeni su nazivi i pristupni brojevi (NCBI) proteina koji su identificirani uz najveći *score*, iz koje vrste potječu te molekularna masa i pI navedeni u bazi podataka Uniprot. U slučaju kad nije identificiran protein iz vrste *N. tabacum*, naveden je i homologni protein iz ove vrste pronađen pomoću BLASTp alata. Biološka kategorija i proces u kojem protein sudjeluje navedeni su prema bazi podataka Uniprot. Razlikovna ekspresija izražena je u usporedbi s kontrolom ukoliko je postotak volumena mrlje barem 1,5 puta veći (↑) ili manji (↓) nego u kontroli te ako je podjednak (=) ili ako mrlja izostaje (×).

BR.	NAZIV PROTEINA, PRISTUPNI BROJ	VRSTA	SCORE	m [Da]	pI	BLASTp <i>N. tabacum</i> , NAZIV PROTEINA, PRISTUPNI BROJ	BIOLOŠKA KATEGORIJA - BIOLOŠKI PROCES	RAZLIKOVNA EKSPRESIJA
1-4	Podjedinica reakcijskog centra fotosustava I ACZ72945	<i>Nicotiana tabacum</i>	187;197; 204	18039	9,19	-	Fotosinteza	AgNO <sub>3</sub> ↑ AgNP-bPEI ↑ AgNP-citrat ↑ AgNP-PEG ↑
5	<i>Predviđen:</i> protein niske kvalitete: protein za popravlak fotosustava II PSB27-H1, kloroplastni XP_004243333	<i>Solanum lycopersicum</i>	110	18957	9,93	<i>Predviđen:</i> PSB27-H1 protein koji služi za popravlak fotosustava II, sličan kloroplastnom, XP_016516160	Fotosinteza (Stanični odgovor na intenzitet svjetla, popravlak i organizacija fotosustava II)	AgNO <sub>3</sub> ↑ AgNP-bPEI ↑ AgNP-citrat ↑ AgNP-PEG ↑
6	Fe-S centar fotosustava I ACH47585	<i>Geranium carolinianum</i>	197	9022	6,68	Fe-S centar fotosustava I NP_054558	Fotosinteza (transport elektrona u fotosustavu I)	AgNO <sub>3</sub> ↑ AgNP-bPEI ↑ AgNP-citrat ↑ AgNP-PEG ↑
7	Peroksiredoksin Q, kloroplastni NP_001296953	<i>Solanum lycopersicum</i>	368	23540	9,46	<i>Predviđen:</i> peroksiredoksin Q, sličan kloroplastnom XP_016485371	Odgovor na stres; Fotosinteza	AgNO <sub>3</sub> ↑ AgNP-bPEI ↑ AgNP-citrat = AgNP-PEG ↑
8-9	PsbQ BAD97359	<i>Nicotiana tabacum</i>	262; 411	24157	9,50	-	Fotosinteza	AgNO <sub>3</sub> ↑ AgNP-bPEI ↑ AgNP-citrat = AgNP-PEG ↑

BR.	NAZIV PROTEINA, PRISTUPNI BROJ	VRSTA	SCORE	m [Da]	pI	BLASTp <i>N. tabacum</i> , NAZIV PROTEINA, PRISTUPNI BROJ	BIOLOŠKA KATEGORIJA - BIOLOŠKI PROCES	RAZLIKOVNA EKSPRESIJA
10	PSI-E2=14.3 fotosustav I psaE produkt, N-terminalni AAB29517	<i>Nicotiana sylvestris</i>	130	Nema podataka	Nema podataka	-	Fotosinteza	AgNO <sub>3</sub> ↑ AgNP-bPEI ↑ AgNP-citrat ↑ AgNP-PEG ↑
11	Podjedinica IVB rekcijskog centra fotosustava I, kloroplastna Q41229	<i>Nicotiana sylvestris</i>	135	15224	9,74	<i>Predviđen:</i> Podjedinica IVB rekcijskog centra fotosustava I, kloroplastna XP_016496470	Fotosinteza	AgNO <sub>3</sub> ↑ AgNP-bPEI ↑ AgNP-citrat ↑ AgNP-PEG ↑
12	Prekursor PSI- D1 BAA02871	<i>Nicotiana sylvestris</i>	194	23456	9,84	<i>Predviđen:</i> Podjedinica II reakcijskog centra fotosustava I, slična kloroplastnoj XP_016455922	Fotosinteza	AgNO <sub>3</sub> ↑ AgNP-bPEI ↑ AgNP-citrat ↑ AgNP-PEG ↑
13	<i>Predviđen:</i> Protein CBSX3 koji sadrži CBS domene, sličan mitohondrijsko m, XP_006344361	<i>Solanum tuberosum</i>	148	22545	9,46	<i>Predviđen:</i> Protein CBSX3 koji sadrži CBS domene, sličan mitohondrijskom, XP_016442049	Odgovor na stres (stanična redoks homeostaza, odgovor na solni stres)	AgNO <sub>3</sub> × AgNP-bPEI ↑ AgNP-citrat = AgNP-PEG ↑
14	Aminometil- transferaza, mitohondrijska NP_001275291	<i>Solanum tuberosum</i>	474	44277	8,77	<i>Predviđen:</i> Aminometil- transferaza, mitohondrijska XP_016485574	Metabolizam (katabolički proces glicina)	AgNO <sub>3</sub> ↑ AgNP-bPEI ↑ AgNP-citrat = AgNP-PEG ↑
15	Protein bogat glicinom-2 P27484	<i>Nicotiana sylvestris</i>	207	19746	5,64	<i>Predviđen:</i> Protein bogat glicinom-2 XP_016516220	Regulacija transkripcije	AgNO <sub>3</sub> ↑ AgNP-bPEI ↑ AgNP-citrat ↑ AgNP-PEG ↑
16	Glicinom bogati RNA vezni protein ACD03270	<i>Nicotiana tabacum</i>	212	15626	5,23	-	Vezanje nukleotida	AgNO <sub>3</sub> ↑ AgNP-bPEI ↓ AgNP-citrat ↓ AgNP-PEG ↓

BR.	NAZIV PROTEINA, PRISTUPNI BROJ	VRSTA	SCORE	m [Da]	pI	BLASTp <i>N. tabacum</i> , NAZIV PROTEINA, PRISTUPNI BROJ	BIOLOŠKA KATEGORIJA - BIOLOŠKI PROCES	RAZLIKOVNA EKSPRESIJA
17	ATP sintaza, CF1 epsilon podjedinica (plastidna) NP_054505	<i>Nicotiana tabacum</i>	432	14607	5,18	-	Transport (transport protona vezan uz sintezu ATP- a u kloroplastu)	AgNO <sub>3</sub> ↑ AgNP-bPEI ↑ AgNP-citrat ↑ AgNP-PEG ↑
18	Rieske Fe/S protein citokroma b6/f kompleksa CAA45705	<i>Nicotiana tabacum</i>	180	24152	7,59	-	Fotosinteza	AgNO <sub>3</sub> ↑ AgNP-bPEI ↑ AgNP-citrat ↑ AgNP-PEG ↑
19	14-3-3 sličan protein D O49996	<i>Nicotiana tabacum</i>	96	28257	4,76	-	Odgovor na stres	AgNO <sub>3</sub> = AgNP-bPEI ↑ AgNP-citrat ↑ AgNP-PEG ↑
20	Ubikvitin konjugirani enzim E2, varijanta 1D NP_001306880	<i>Solanum lycopersicum</i>	257	16603	6,20	Ubikvitin konjugirani enzim E2, varijanta 1D XP_016512152	Popravlak (popravlak nakon replikacije)	AgNO <sub>3</sub> = AgNP-bPEI ↑ AgNP-citrat ↑ AgNP-PEG ↑
21	Kloroplastni PsbP4 prekursor AFH58004	<i>Nicotiana benthamiana</i>	325	28580	7,65	<i>oxygen-evolving enhancer</i> protein 2-1, sličan kloroplastnom NP_001311962	Fotosinteza	AgNO <sub>3</sub> ↑ AgNP-bPEI ↑ AgNP-citrat ↑ AgNP-PEG ↑
22	23 kDa polipeptid oksidirajućeg kompleksa fotosustava II CAA45700	<i>Nicotiana tabacum</i>	202	21971	5,28	-	Fotosinteza	AgNO <sub>3</sub> ↑ AgNP-bPEI ↑ AgNP-citrat ↑ AgNP-PEG ↑
23	Željezo superoksid dismutaza AHG12637	<i>Nicotiana tabacum</i>	286	28338	8,60	-	Odgovor na stres	AgNO <sub>3</sub> ↑ AgNP-bPEI ↑ AgNP-citrat = AgNP-PEG ↑

BR.	NAZIV PROTEINA, PRISTUPNI BROJ	VRSTA	SCORE	m [Da]	pI	BLASTp <i>N. tabacum</i> , NAZIV PROTEINA, PRISTUPNI BROJ	BIOLOŠKA KATEGORIJA - BIOLOŠKI PROCES	RAZLIKOVNA EKSPRESIJA
24	a) Askorbat peroksidaza AAA86689  b) citosolna askorbat peroksidaza BAA12918	<i>Nicotiana tabacum</i>	a) 674 b) 633	a) 27388 b) 27470	a) 5,43 b) 5,43	-	Odgovor na stres (oksidativni stres)	AgNO <sub>3</sub> ↑ AgNP-bPEI ↑ AgNP-citrat ↑ AgNP-PEG ↑
ni-1	Nije identificiran							AgNO <sub>3</sub> ↑ AgNP-bPEI ↑ AgNP-citrat ↑ AgNP-PEG ↑
ni-2	Nije identificiran							AgNO <sub>3</sub> ↓ AgNP-bPEI ↑ AgNP-citrat = AgNP-PEG ↑

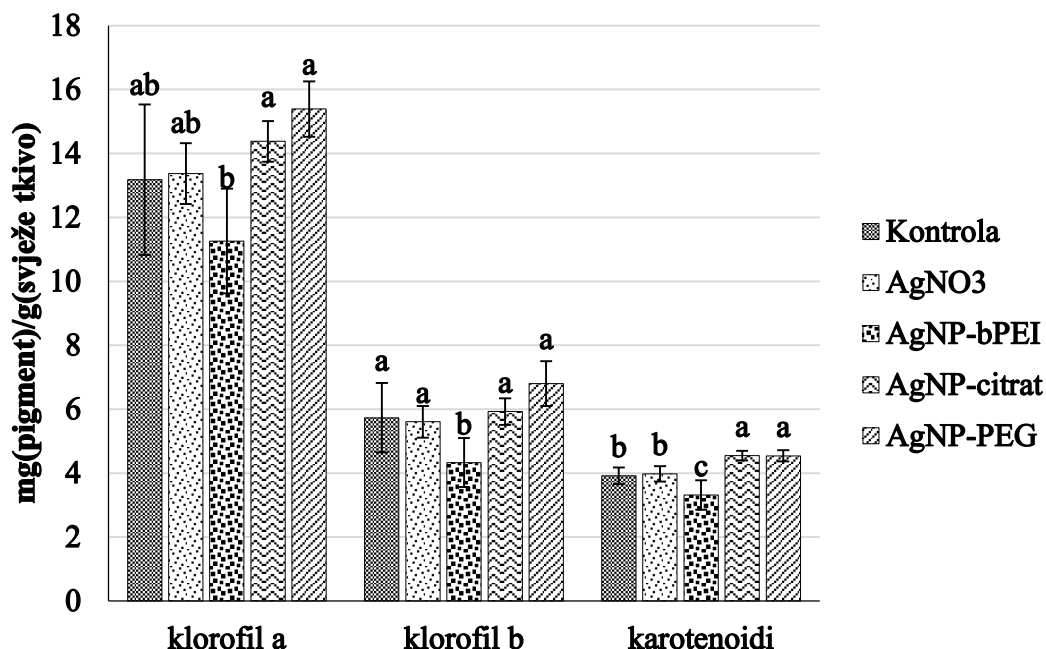


Slika 12: Kategorizacija identificiranih proteina koji se po ekspresiji razlikuju u odnosu na kontrolu u klijancima tretiranim nanočesticama i ionima srebra. Na pozitivnoj osi prikazan je broj proteina povišene ekspresije, a na negativnoj osi smanjene. Pita dijagram prikazuje udio pojedinih kategorija među ukupnim proteinima.

#### 4.5. Sadržaj fotosintetskih pigmenata

Među tretmanima postoje značajne razlike u sadržaju fotosintetskih pigmenata (Slika 13). Sadržaj klorofila *a* u klijancima tretiranim AgNP ne odstupa značajno od kontrole i tretmana ionima srebra. Ipak postoji razlika među AgNP s različitim omotačima: klijanci tretirani AgNP-bPEI sadrže statistički značajno manje klorofila *a* nego klijanci tretirani AgNP-citrat i AgNP-PEG. Sadržaj klorofila *b* je ujednačen u tretmanima i kontroli, osim u slučaju AgNP-bPEI, gdje je statistički značajno manji. Ukupni sadržaj karotenoida ne razlikuje se značajno između kontrole i tretmana ionima srebra, ali je u slučaju AgNP-citrat i AgNP-PEG značajno veći, a u

slučaju AgNP-bPEI značajno manji nego u kontroli. Po sadržaju fotosintetskih pigmenata klijanci tretirani ionima srebra ne razlikuju se od kontrolnih klijanaca. Između klijanaca tretiranih AgNP s omotačima od citrata i PEG-a također nema razlike u sadržaju fotosintetskih pigmenata.



Slika 13: Sadržaj klorofila *a*, klorofila *b* i ukupnih karotenoida u klijancima duhana tretiranim 100 µM ionskim srebrom, 100 µM nanočesticama srebra (AgNP-citrat, AgNP-PEG, AgNP-bPEI) te u kontrolnim klijancima. Različita slova iznad stupaca označavaju statistički značajne razlike među skupinama za pojedine pigmente (Duncan test,  $p < 0,05$ ).

#### 4.6. Fluorescencija klorofila

Parametri fluorescencije klorofila (Tablica 17)  $F_0$ ,  $F_m$ ,  $F_p$  i  $Q_{pD3}$  ne pokazuju statistički značajne razlike među tretmanima. Maksimalni kvantni prinos PSII,  $QY_{max}$ , značajno je veći u kotiledonima klijanaca duhana tretiranim ionima srebra nego u kontrolnim klijancima, ali tretmani nanočesticama ne odstupaju značajno ni od kontrole, ni od iona srebra, niti međusobno. Kvantni prinos PSII tijekom trajanja osvjetljenja,  $QY_{Lss}$ , manji je u tretmanu ionima srebra te AgNP-citrat i AgNP-PEG, dok kod AgNP-bPEI ne odstupa značajno od kontrole. Tretman AgNP-PEG ima značajno manji  $QY_{Lss}$  od svih ostalih tretmana. U istom je trenutku  $NPQ_{Lss}$  kod tretmana AgNP-citrat, AgNP-PEG te ionskim srebrom značajno manji u odnosu na kontrolu, dok se AgNP-bPEI od nje ne razlikuje značajno. Fotokemijsko gašenje u tom trenutku,  $Q_{pLss}$ , u svim tretmanima ima manje vrijednosti nego u kontroli, a u AgNP-PEG čak

značajno manje nego u ostalim tretmanima. NPQ u uvjetima mraka, NPQ<sub>D3</sub>, u tretmanima nanočesticama ne odstupa od kontrole, dok je u tretmanu srebrom značajno veći. U istom trenutku među tretmanima nema razlike u fotokemijskom gašenju, Q<sub>pD3</sub>.

Tablica 17: Parametri fluorescencije klorofila *a*. Navedene su srednje vrijednosti i standardne devijacije. Različita slova u retku označavaju skupine koje se značajno razlikuju prema Duncanovom testu,  $p < 0,05$ .

Parametar	Kontrola	AgNO <sub>3</sub>	AgNP-bPEI	AgNP-citrat	AgNP-PEG
F <sub>0</sub>	4798,2 ± 552,6 a	4896,0 ± 480,7 a	5090,6 ± 862,3 a	4925,0 ± 331,9 a	4856,6 ± 290,2 a
F <sub>m</sub>	23479,4 ± 2243,9 a	25105,2 ± 2819,2 a	25443,0 ± 3807,0 a	24992,8 ± 1719,5 a	23960,4 ± 1689,8 a
F <sub>p</sub>	23205,8 ± 2341,2 a	25663,8 ± 2813,5 a	25644,6 ± 4064,6 a	25472,0 ± 1810,4 a	24603,8 ± 1820,7 a
QY <sub>max</sub>	0,796 ± 0,005 a	0,806 ± 0,005 b	0,802 ± 0,008 ab	0,803 ± 0,005 ab	0,798 ± 0,004 ab
QY <sub>Lss</sub>	0,156 ± 0,036 a	0,102 ± 0,016 b	0,122 ± 0,039 ab	0,105 ± 0,010 b	0,046 ± 0,009 c
NPQ <sub>Lss</sub>	0,414 ± 0,046 a	0,342 ± 0,018 bc	0,390 ± 0,041 ab	0,333 ± 0,033 c	0,338 ± 0,038 bc
NPQ <sub>D3</sub>	0,116 ± 0,018 a	0,136 ± 0,009 b	0,116 ± 0,023 ab	0,105 ± 0,006 a	0,112 ± 0,004 a
qP <sub>Lss</sub>	0,254 ± 0,055 a	0,164 ± 0,023 b	0,194 ± 0,057 b	0,170 ± 0,022 b	0,078 ± 0,011 c
qP <sub>D3</sub>	0,930 ± 0,007 a	0,936 ± 0,005 a	0,936 ± 0,005 a	0,938 ± 0,005 a	0,932 ± 0,008 a



## 5. Rasprava

Nanočestice se sve češće koriste u komercijalno dostupnim proizvodima, odakle mogu izravno ili neizravno dospjeti u okoliš. Premda njihova upotreba u nekim slučajevima djeluje pogodno, AgNP zbog svoje toksičnosti mogu ugroziti zdravlje okoliša i ljudi. Njihov učinak na mikrobe i životinje istražen je više od učinka na biljke pa će moji rezultati doprinijeti razumijevanju štetnog djelovanja AgNP na biljke. Duhan, kao komercijalna kultura i uobičajen modelni organizam u molekularnoj biologiji, te klijanci, kao posebno osjetljiva faza biljnog razvoja, čine primjenjiv i za uzgoj jednostavan eksperimentalni sustav. Uočila sam da AgNP uzrokuju promjene u strukturi korijena i ultrastrukturi kloroplasta klijanaca duhana, da uzrokuju uglavnom pojačanu ekspresiju proteinskih biljega vezanih uz fotosintezu i oksidativni stres te da utječu na parametre fotosinteze i sadržaj fotosintetskih pigmenata klijanaca duhana. Zbog ujednačenosti oblika i veličine AgNP korištenih u ovom eksperimentu, oblik i veličina AgNP mogu se odbaciti kao uzrok razlika u toksičnosti AgNP. Iz tog razloga razlike u utjecaju tretmana na klijance duhana proizlaze iz različitih molekula-omotača koje stabiliziraju AgNP, te ih mogu međusobno uspoređivati, kao što ću usporediti i različit utjecaj iona i nanočestica srebra.

### 5.1. Promjene u morfologiji i ultrastrukturi

Poznato je da AgNP mogu ući u korijen biljaka i da se AgNP (veličine čak 40 nm) mogu probiti kroz staničnu stijenku, ući u stanice, prolaziti kroz plazmodezmije (Geisler-Lee i sur. 2013) te se putem provodnog sustava proširiti na nadzemne dijelove biljke, a ukoliko se kotiledoni ili listovi nađu u dodiru s AgNP, mogu ući u njih kroz puči (Geisler-Lee i sur. 2014). Stoga ne čudi da su AgNP izazvale morfološke promjene u korijenu i ultrastrukturne promjene u kloroplastima klijanaca duhana.

Yin i sur. (2011) istražili su učinak AgNP različitih veličina te ionskog srebra na klijance ljulja (*Lolium multiflorum*). Utvrdili su da je učinak AgNP negativan i proporcionalan specifičnoj površini AgNP te da su AgNP toksičnije od ekvivalentne koncentracije ionskog srebra. Slično kao i u slučaju klijanaca duhana, tretman srebrom uzrokovao je kod ljulja inhibiciju rasta korijena, oštećenje korijenove kape i epiderme, vakuolizaciju i kolaps stanica korteksa te poremećen gravitropizam. Kod klijanaca duhana nisam uočila poremećen gravitropizam, što može biti zbog načina uzgoja klijanaca u tekućem mediju uz stalnu rotaciju, no vjerojatnije je da srebro u slučaju korijena duhana jednostavno ne izaziva takav odgovor. Ipak, eksperiment bi se mogao ponoviti uz uzgoj klijanaca na krutom mediju, što bi olakšalo i morfometriju

korijena. Kao moguće uzroke oštećenja korijena Yin i sur. (2011) naveli su apoptozu uzrokovanu oksidativnim stresom i poremećaj toka auksina. Utjecaj AgNP različitih veličina i koncentracija na klijance uročnjaka pratili su Geisler-Lee i sur. (2013). Također su uočili smanjen rast korijena ovisan o koncentraciji te pokazali da se AgNP nakupljaju oko korijenove kape klijanaca uročnjaka te da ulaze u tkiva korijena kroz međustanični prostor. AgNP su razorno djelovale na korijenovu kapu, a pretpostavljaju da je rast korijena bio usporen zbog uništenja inicijalnih stanica u vršnom meristemu korijena.

Iako većina istraživanja pokazuje negativan učinak AgNP i iona srebra na produžni rast korijena i biljni rast općenito, neka istraživanja navode pozitivan učinak. Mustafa i sur. (2015) su primijetili da ista vrsta AgNP pri koncentraciji 2 ppm ima pozitivan učinak na poplavljene klijance soje, a koncentracija od 20 ppm ima letalan učinak. Koncentracija AgNP i AgNO<sub>3</sub> u mom eksperimentu je visoka (100 μM odgovara otprilike 17 ppm) i očito ima negativni učinak na rast korijena klijanaca duhana, no Syu i sur (2014) su pri tretmanu klijanaca uročnjaka nanočesticama slične veličine i iste koncentracije kao u mom eksperimentu uočili pojačan rast korijena. Prag pri kojem učinak AgNP prelazi iz pozitivnog u negativni vjerojatno ovisi o vrsti AgNP, ali i o vrsti biljke.

Već je desetljećima poznato da je ionsko srebro učinkovit inhibitor odgovora na plinoviti biljni hormon etilen (Beyer 1976) te se njegova primjena uvriježila u istraživanjima etilena. Syu i sur. (2014) su pokazali da se u istu svrhu mogu koristiti i AgNP jer i one inhibiraju odgovor na etilen. Etilen inhibira produžni rast korijena i hipokotila, a ioni srebra i AgNP taj učinak mogu spriječiti. Nadalje, ioni srebra smanjuju nakupljanje biljnog hormona auksina u vršku korijena, poticanjem njegovog odvođenja na za sad nepoznat način neovisan o etilenu, što također rezultira jačim produžnim rastom korijena (Strader i sur. 2009). Ova istraživanja stoga ukazuju da bi tretmani srebrom trebali uzrokovati jači produžni rast korijena, no to se kosi s rezultatima mog eksperimenta. Mehanizam djelovanja AgNP na korijen nije dovoljno istražen i u budućim bi eksperimentima trebalo ispitati djelovanje AgNP na biljne hormone, posebice auksin. Yuan i sur (2013) istražili su inhibitorno djelovanje iona bakra na brzinu rasta korijena uročnjaka. Pritom su koristili transgenične klijance uročnjaka koji omogućuju vizualizaciju gradijenta auksina, stanica u diobi ili lokalizacije raznih proteina koji sudjeluju u transportu auksina. Ustanovili su da ioni bakra utječu na redistribuciju transportera auksina Pin-formed1 (PIN1), što uzrokuje veću akumulaciju auksina u korijenovom vršku, manju učestalost staničnih dioba i smanjenje meristemske zone. Budući da sam u klijancima duhana tretiranim ionima i

nanočesticama srebra uočila inhibitorni učinak na korijen i smanjenje meristemske zone, vrijedilo bi sličnim eksperimentom ispitati mehanizam djelovanja AgNP i iona srebra.

Promjene u ultrastrukтури kloroplasta je kudikamo teže istražiti nego promjene u strukturi korijena, stoga su i slabije zastupljene u literaturi. Promjene kloroplasta riže tretirane nanočesticama bakrovog (II) oksida (CuONP) uočili su Da Costa i sur. (2015). Kloroplasti su pri višim koncentracijama CuONP imali manje tilakoida u granama, naborane tilakoidne membrane i veći tilakoidni lumen. Alkhatib i sur. (2011) primijetili su gušće grana-tilakoide i veća škrobna zrnca u kloroplastima duhana tretiranog olovom. Te promjene tek djelomično slične onima koje sam uočila u klijancima duhana tretiranim ionima i nanočesticama srebra. Literatura o utjecaju stresa uzrokovanog nanočesticama ili metalima na ultrastrukturu kloroplasta je oskudna, kao i primjeri ultrastrukture kloroplasta duhana, a o utjecaju AgNP na kloroplaste još nema podataka.

## 5.2. Promjene u proteomu

U proteomu klijanaca pod utjecajem nanočestica i iona srebra došlo je do promjene ekspresije proteina iz sedam bioloških kategorija te je uglavnom riječ o povećanju ekspresije. Čak dvije trećine identificiranih proteina imaju funkciju u fotosintezi, što do sad u literaturi nije zabilježeno. Nakon prevladavajućih fotosintetskih proteina, proteini povezani s odgovorom na stres su iduća brojna skupina. Proteini s funkcijom u popravku, transportu, metabolizmu, regulaciji transkripcije i vezanju nukleotida zastupljeni su s po jednim identificiranim proteinom, a dva proteina s razlikovnom ekspresijom nisu identificirana. Već sama zastupljenost proteina vezanih uz fotosintezu u proteomu cjelovitih klijanaca ukazuje na to da je proteom izdanaka zasjenio proteom korijena, stoga bi u budućim istraživanjima trebalo odijeliti korijene od izdanaka te njihove proteome proučavati zasebno, kako bi se moglo identificirati više proteina. Također bi bilo zanimljivo usporediti proteome biljaka tretiranih niskim koncentracijama AgNP, koje bi prema nekim istraživanjima mogle biti stimulativne, i onih koje su tretirane visokim, inhibitornim koncentracijama AgNP, kao u mom eksperimentu. Do sad je provedeno tek nekoliko istraživanja proteoma u kontekstu tretmana nanočesticama i ionima srebra. Prema istraživanju Vaninni i sur. (2013), koje pokazuje pozitivan učinak AgNP na rast korijena, skupina proteina uključenih u odgovor na stres pokazala se prevladavajućom u odgovoru korijena biljke *Eruca sativa* na tretman srebrovim nitratom. Oni su također uočili velike razlike u funkcijama proteina koji reagiraju na tretman AgNP i tretman ionima srebra, u vidu da se pri tretmanu AgNP najviše mijenja ekspresija skladišnih proteina kruciferina, a

proteina vezanih uz odgovor na stres i metabolizam identificirano je manje nego u slučaju tretmana ionskim srebrom. Neki od proteina koji su identificirani kao osjetljivi na srebro u korijenu *E. sativa* slični su po funkciji proteinima koji su u klijancima duhana identificirani u ovom istraživanju. To su superoksid dismutaza i peroksiredoksin tipa 2, te podjedinice ATP sintaze.

Moje istraživanje pokazuje da proteom klijanaca duhana slično reagira na srebro u obliku nanočestica i iona. Ipak, nekoliko proteina pokazalo je različit odgovor na AgNO<sub>3</sub> i AgNP, te na AgNP s različitim omotačima. Sedam proteina nije pokazalo reakciju na tretman AgNP-citrat, a dva proteina nisu pokazala reakciju na ionsko srebro. Jedan protein pokazao je smanjenu ekspresiju u odgovoru na ionsko srebro, a jedan drugi u odgovoru na AgNP. Ovi proteini vjerojatno imaju ulogu u različitom odgovoru na stres ionima i nanočesticama te na različite nanočestice, stoga ću se na njih posebno osvrnuti, kao i na funkcionalne skupine identificiranih proteina.

#### 5.2.1. Proteini vezani uz fotosintezu

Najveća skupina proteina koje sam identificirala zbog razlike u ekspresiji pod utjecajem različitih tretmana srebrom pripada proteinima vezanim uz fotosintezu. U 16 proteinskih mrlja identificirano je 11 takvih proteina. Od toga njih pet sudjeluje u organizaciji PSI (mrlje 1-4, 6, 10, 11, 12), pet u organizaciji i regulaciji PSII (mrlje 5, 7, 8-9, 21,22), a jedan (mrlja 18) je sastavni dio citokroma b6-f. Svi ovi proteini sudjeluju direktno ili indirektno u kloroplastnom lancu prijenosa elektrona. Tu bi se također mogao ubrojiti i protein iz kategorije transporta, CF1 epsilon podjedinicu plastidne ATP sintaze (mrlja 17), koja sudjeluje u sintezi ATP-a vezanoj uz fotosintezu. Ekspresija ovih proteina je povećana u svim tretmanima, osim za PsbQ i peroksiredoksin Q (PrxQ, također uključen u odgovor na stres), koji u odgovoru na AgNP-citrat ne odstupaju od kontrole. Unatoč važnosti skupine proteina koji sudjeluju u fotosintezi i njihovoj zastupljenosti u mojim rezultatima, njihova uloga u odgovoru na tretmane srebrom do sada nije istražena. Jedino su Mustafa i sur. (2015) u proteomu potopljenih klijanaca soje identificirali nekoliko podjedinica PSII čija je ekspresija promijenjena zbog tretmana AgNP, no to nisu one podjedinice čija se ekspresija mijenja u slučaju klijanaca duhana.

#### 5.2.2. Proteini vezani uz odgovor na stres

AgNP uzrokuju oksidativni stres, što se često navodi kao glavni mehanizam njihove toksičnosti (Tripathi i sur 2017, Wijnhoven i sur. 2009). Oksidativni stres posredovan je nastankom

reaktivnih oblika kisika (eng. *reactive oxygen species*, ROS) i u manjoj mjeri dušika te oštećenjima koja oni uzrokuju. ROS nastaju prijenosom elektrona na molekulu kisika ( $O_2$ ) ili pobuđivanjem kisika u reaktivniji singletni oblik ( $O_2^1$ ). Djelomičnom redukcijom kisika nastaju peroksidni radikal ( $O_2^-$ ), vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ) i hidroksilni radikal ( $HO^\cdot$ ). Ovi oblici su toksični jer reagiraju s različitim staničnim komponentama i pritom ih oštećuju. ROS najčešće nastaju u kloroplastima, mitohondrijima i peroksisomima, uglavnom kao nusprodukti lanca prijenosa elektrona, ali se i aktivno proizvode radi obrane od patogena. Uzrokuju peroksidaciju lipida, oksidaciju proteina, inhibiciju enzima i oštećenja DNA i RNA, a prevelika oštećenja mogu dovesti do programirane stanične smrti (Mittler, 2002). Biljke su razvile složen sustav obrane od ROS-a koji uključuje izbjegavanje njihovog nastanka i sprječavanje njihovog djelovanja. To postižu sintezom antioksidansa, poput askorbinske kiseline i glutaciona, te pomoću enzima koji uklanjaju ROS. Najvažniji među njima su superoksid-dismutaze (SOD), askorbat-peroksidaze (APX) i katalaze (CAT) (Mittler, 2002) te se aktivnost ovih enzima često ispituje u toksikološkim istraživanjima. ROS su važni indikatori staničnog stresa i kao sekundarni glasnici uključeni su u signalizaciju na razini organela, stanice i cijele biljke (Suzuki i sur. 2012). Poznato je da razni teški metali uzrokuju neravnotežu ROS-a i antioksidansa (pregled u Cuypers i sur. 2016).

Cvjetko i sur. (2017) potvrdili su da AgNP i ioni srebra uzrokuju povećanje sadržaja ROS-a u korijenu luka (*Allium cepa*) i porast oštećenja u vidu peroksidacije lipida, karbonilacije proteina i lomova DNA. Aktivnost enzima pirogalol peroksidaze bila je povećana, a aktivnost APX i CAT smanjena pod utjecajem AgNP i iona srebra. Pritom su ioni pokazali veću toksičnost, a AgNP su pokazale različite učinke ovisno o omotaču. Thuesombat i sur. (2016) su pokušali aklimatizirati rižu na solni stres tretiranjem sjemenki nanočesticama srebra prije isključivanja. Uočili su da AgNP mogu povići razinu  $H_2O_2$  u korijenu i izdanku klijanaca te povećati aktivnost CAT, SOD, APX te glutation peroksidaze i glutation reduktaze, no efekt je bio različit ovisno o veličini AgNP. Ipak, razlika u aktivnosti antioksidativnih enzima ne mora odražavati razliku u njihovoj ekspresiji, no ekspresija se u ovom kontekstu tek rijetko istražuje. U korijenima klijanaca mung graha (*Vigna radiata*) isključivanima na AgNP tretmanu povećana je ekspresija mRNA koja kodira za Cu/Zn-SOD, ekspresija CAT mRNA je povećana pri nižim i smanjena pri najvišoj koncentraciji AgNP, a u ekspresiji APX mRNA nije bilo značajne razlike (Nair i Chung 2015). U proteomu korijena biljke *Eruca sativa* identificirani su proteini peroksiredoksin tipa 2 i superoksid dismutaza, čija je ekspresija povećana pod utjecajem AgNP i iona srebra (Vaninini i sur. 2013). Moji rezultati u skladu su s dosadašnjim istraživanjima.

Među proteinima čija je ekspresija promijenjena u odgovoru na AgNP i ione srebra identificirala sam 5 proteina koji sudjeluju u odgovor na stres. Među njima se ističu proteini s ulogom u neutralizaciji ROS: peroksiredoksin Q (mrlja 7), željezo-superoksid dismutaza (mrlja 23) i dva izozima askorbat peroksidaze (mrlja 24). Bilo bi zanimljivo u budućnosti istražiti je li aktivnost ovih enzima u skladu s porastom ekspresije.

Prvu crtu obrane od ROS čini skupina enzima superoksid dismutaza (SOD). One pomoću metalnih kofaktora reduciraju visoko reaktivni peroksidni radikal u slabije reaktivni vodikov peroksid. Različiti stanični odjeljci imaju različite tipove SOD: one sa željeznim kofaktorom lokalizirane su u kloroplastima (Fe-SOD), one s manganskim kofaktorom nalaze se u mitohondrijima i peroksisomima (Mn-SOD), a one s kofaktorima bakra i cinka prisutne su u gotovo svakom staničnom odjeljku te u izvanstaničnom prostoru (Cu/Zn-SOD) (Alscher i sur. 2002). Među proteinskim biljezima identificiranim u mom eksperimentu nalazi se i Fe-SOD (mrlja 23), a njegova je ekspresija povišena u svim tretmanima osim u tretmanu AgNP-citrat.

Askorbat peroksidaze (APX) pripadaju skupini peroksidaza koje sadrže prostetičku skupinu s hemom. Peroksidaze reduciraju vodikov peroksid u vodu uz popratnu oksidaciju antioksidansa, koji je u slučaju APX askorbinska kiselina. Izozimi APX mogu se naći u različitim odjeljcima biljnih stanica, topivi ili vezani uz membrane. Njihova se ekspresija mijenja pod utjecajem raznih vrsta stresa, poput visoke i niske temperature, jakog osvjetljenja, suše, soli i teških metala (pregled u Caverzan i sur. 2012). U mom eksperimentu identificirana su dva izozima APX (oba u mrlji 24) čija je ekspresija povišena u odgovoru na sve tretmane srebrom.

Peroksiredoksin Q (PrxQ) je enzim koji također reducira vodikov peroksid, ali i alkilne hidroksiperokside i peroksinitrit. Ne sadrži prostetičke skupine, nego dva katalitička cisteinska ostatka koji se uslijed redukcije peroksida povežu u disulfidni most te je za ponovnu aktivaciju enzima potrebna redukcija, uglavnom pomoću tioredoksina y (Dietz i sur. 2006, Tripathi i sur. 2009). Lokaliziran je u kloroplastu, gdje asocira s fotosintetskim membranama u blizini PSII te ga štiti od oksidacijskih oštećenja. Pretpostavlja se da zbog male mase može ući u tijesne prostore grana-tilakoida, kamo druge peroksidaze teško mogu doprijeti, što mu daje značajnu ulogu u fotosintezi (Lamkemeyer i sur. 2006). Poznato je da je ekspresija PrxQ povećana tijekom oksidativnog stresa i obrane od patogena, a vjerojatno ima i genoprotektivnu ulogu (Dietz i sur. 2006). Prema mojim rezultatima PrxQ ima ulogu i u odgovoru na stres uzrokovan ionima i nanočesticama srebra. Identificirala sam ga u mrlji 7, a njegova je ekspresija povišena u svim tretmanima osim u tretmanu AgNP-citrat.

Među proteinskim biljezima identificiranim u mom eksperimentu posebno je zanimljiva mrlja 13 s predviđenim proteinom CBSX3 koji sadrži domene cistation  $\beta$ -sintaze (CBS). Njegova ekspresija je u odgovoru na AgNP-PEG i AgNP-bPEI povećana u odnosu na kontrolu, u AgNP-citrat nema razlike, a u tretmanu AgNO<sub>3</sub> mrlja nije detektirana. O skupini proteina s CBS domenama zna se vrlo malo, a pretpostavlja se da reguliraju enzimsku aktivnost tioredoksina te tako održavaju redoks homeostazu i sudjeluju u biljnom razvoju i odgovoru na stres (Yoo i sur. 2011). Mitohondrijski CBSX3 mogao bi imati ulogu u različitom odgovoru biljaka na stres uzrokovan ionima i nanočesticama srebra.

Među proteinima koji različito reagiraju na nanočestice i ione srebra je i u mrlji 19 predviđen protein 14-3-3 sličan varijanti D. Njegova je ekspresija povećana u odgovoru na tretman nanočesticama, ali ne i ionima srebra. Proteini porodice 14-3-3 vežu se kao dimeri tipično na fosfatizirane motive proteina, reguliraju aktivnost proteinskih kinaza i moduliraju raznovrsne stanične odgovore. Među interakcijskim partnerima proteina 14-3-3 kod biljaka ističu se kanali, nosači i pumpe koji sudjeluju u transportu protona, iona, teških metala, vode ili organskih molekula te proteini koji sudjeluju u sintezi i odgovoru na gotovo sve vrste biljnih hormona (auksine, citokinine, gibereline, brasinosteroide, etilen i abscizinsku kiselinu). Očito je da ovi proteini imaju ulogu u širokom spektru staničnih odgovora, uključujući i odgovor na razne stresne čimbenike, no specifične uloge njihovih brojnih izoformi još nisu poznate (Jaspert i sur. 2011). Pretpostavljam da izoforma 14-3-3 slična varijanti D ima do sad neopisanu ulogu u moduliranju staničnog odgovora na stres uzrokovan nanočesticama, barem u slučaju klijanaca duhana.

### 5.2.3. Ostali proteini

Glicinom bogati RNA-vezni protein (mrlja 16) jedini predstavnik je proteina koji vežu nukleotide identificiran u ovom eksperimentu. U odgovoru na AgNP različitih omotača njegova je ekspresija smanjena, a u odgovoru na AgNO<sub>3</sub> je povećana u odnosu na kontrolu. Poznato je da ovaj protein veže jednolančanu RNA i DNA te dvolančanu DNA. U duhanu je mRNA ovog proteina pojačano esprimirana u odgovoru na vodni stres (poplavu) te nešto slabije odgovara i na druge abiotičke stresove poput suše, solnog stresa te izloženosti hladnoći ili vrućini (Lee i sur. 2009). Klijanici su u mom eksperimentu uzgajani u tekućem mediju te je moguće da je zbog toga aktiviran odgovor na vodni stres. Netretirani klijanici i oni tretirani ionima i nanočesticama srebra bili su uzgajani u jednakom volumenu tekućine, no zbog izrazito male veličine klijanaca tretiranih AgNP, moguće je da jače doživljavaju vodni stres u odnosu na velike klijanice

kontrole i tretmana ionima srebra. Ipak, u slučaju većeg vodnog stresa, očekuje se pojačana ekspresija ovog proteina (s obzirom na pojačanu ekspresiju mRNA), no u mom eksperimentu je slučaj obrnut. Vjerojatno ovaj protein ima još neopisanu ulogu u odgovoru na teške metale te različito reagira na ione i nanočestice.

U mrlji 20 identificiran je protein koji sudjeluje u popravku nakon replikacije, ubikvitin-konjugirani enzim E2 sličan varijanti 1D (UEV1D). Homolozi ovog proteina očuvani su među eukariotima, a u uročnjaku su ga okarakterizirali Wen i sur. (2008). Dio je kompleksa za modifikaciju proteina vezanjem poliubikvitinskog lanca preko lizina 63, čime se mijenja aktivnost proteina, za razliku od poliubikvitinacije preko lizina 48, koja označava proteine za razgradnju. UEV1D sudjeluje u popravku DNA nesklonom pogreškama, a ukoliko je mutiran, biljke su podložnije oštećenju DNA i imaju veću stopu mutacije. UEV1D široko je eksprimiran u uročnjaku, a u polenu i klijancima ima značajniju ulogu od ostalih paraloga. Iako Wen i sur. nisu utvrdili da ovaj protein mijenja ekspresiju u odgovoru na stres, u mojem eksperimentu pokazuje pojačanu ekspresiju specifično u odgovoru na AgNP. Poznato je da AgNP mogu uzrokovati oštećenja DNA (pregled u Tripathi i sur. 2016), na što upućuje i profil ekspresije proteina vezanih uz oksidativni stres. Moguće je da stoga postoji veća potreba za popravkom DNA te je zato u klijancima duhana tretiranim AgNP pojačana ekspresija UEV1D.

Skupinu proteina koji sudjeluju u metaboizmu predstavlja mitohondrijska aminometiltransferaza (naziva se još i protein T; mrlja 14). Ovaj protein dio je kompleksa glicindekarboksilaze (GDC), koji sudjeluje u procesu fotorespiracije razgradnjom glicina nastalog u peroksisomima. Kodiran je u jezgri, a ekspresija mu je aktivirana svjetlošću. Proteini GDC kompleksa čine vrlo velik udio u mitohondrijima fotosintetizirajućih tkiva, pogotovo za vrijeme osvjetljenja, kada dolazi do fotorespiracije (Douce i sur. 2011). Fotorespiracija je proces kojim se štetan produkt oksigenazne aktivnosti enzima ribuloza-1,5-bisfosfat-karboksilaza/oksigenaza (Rubisco), 2-fosfoglikolat, prevodi u 3-fosfoglicerat i vraća u Calvinov ciklus. Tijekom fotorespiracije oslobađa se vodikov peroksid, ali se troše ATP i NADPH te je ovaj proces važan za održavanje redoks homeostaze (Voss i sur. 2012). Ne čudi stoga da je u uvjetima stresa uzrokovanog ionima i nanočesticama srebra, pri kojima dolazi do poremećaja redoks statusa stanice popraćenog pojačanom ekspresijom brojnih fotosintetskih i antioksidativnih enzima, došlo i do povećanja ekspresije aminometiltransferaze. Ipak, tretman nanočesticama stabiliziranim citratom nije utjecao na ekspresiju ovog proteina.



### 5.3. Promjene u sadržaju fotosintetskih pigmenata

Na primjeru sadržaja fotosintetskih pigmenata vidi se kako nanočestice stabilizirane različitim omotačima mogu imati različit utjecaj na biljke. AgNP negativno nabijenog i neutralnog omotača (AgNP-citrat i AgNP-PEG) uzrokovale su blagi porast sadržaja pigmenata, koji je u slučaju ukupnih karotenoida značajan, a pozitivno nabijene AgNP-bPEI imale su suprotan učinak koji samo u slučaju klorofila *a* ne odstupa značajno od kontrole. Ionsko srebro ne utječe značajno na sadržaj fotosintetskih pigmenata, što je još jedan primjer gdje nanočestice imaju štetnije djelovanje od iona iste koncentracije. Jiang i sur. (2012) istražili su utjecaj iona i nanočestica srebra stabiliziranih negativno nabijenom gum-arabicom na vodenu leću i uočili da pri nižim masenim koncentracijama AgNP imaju štetniji učinak od iona srebra na sadržaj klorofila *a*, a pri višim koncentracijama ioni imaju štetniji učinak. Također su uočili da ioni srebra drastičnije smanjuju omjer klorofila *a* i *b* nego AgNP. Negativan učinak negativno nabijenih AgNP na ukupni sadržaj klorofila u klijancima graha mung uočili su i Nair i Chung (2015), ali tek pri koncentraciji 50 mg/L AgNP. Oni su taj učinak povezali sa smanjenjem biomase klijanaca pod utjecajem oksidativnog stresa, što bi mogao biti uzrok oštećenja i u mom eksperimentu. Budući da sam za mjerenje sadržaja pigmenata koristila cjelovite klijance, a ne izdvojene kotiledone, moguće je da je eventualna razlika u masi korijena i hipokotila u različitim tretmanima utjecala na izračun sadržaja pigmenata te bi u budućim istraživanjima na ovaj detalj trebalo pripaziti.

### 5.4. Promjene u parametrima fluorescencije klorofila

Rezultati proteomike pokazali su da iznenađujuće velik broj proteina čija je ekspresija povećana pod utjecajem različitih tretmana srebrom ima funkciju vezanu uz fotosintezu, TEM snimke pokazale su poremećaje u strukturi kloroplasta, a AgNP su utjecale na sadržaj pigmenata važnih za fotosintezu. S obzirom na ovakve rezultate, očekuje se da tretmani ionima i nanočesticama srebra utječu i na parametre fluorescencije klorofila.

Iako moj eksperiment nije pokazao odstupanja temeljne ( $F_0$ ) i maksimalne ( $F_m$ ) fluorescencije klorofila klijanaca duhana tretiranih srebrom, postoji statistički značajna razlika u maksimalnom kvantnom prinosu PSII ( $QY_{max}$ ). Tretman ionima srebra uzrokovao je povećanje  $QY_{max}$ , što upućuje na mogući povoljan učinak iona srebra na fotosintezu klijanaca duhana. Među različitim vrstama AgNP nema značajne razlike, no niti statistički značajnog odstupanja tretmana AgNP od tretmana ionima srebra ili od kontrole. Prema Maxwellu i Johnsonu (2000), uspoređivanje vrijednosti NPQ među skupinama koje imaju značajno različit  $QY_{max}$  treba

izbjegavati zbog toga što se NPQ izražava prema referentnoj vrijednosti tami prilagođenog stanja, a jednaka vrijednost gašenja fluorescencije može se činiti većom ili manjom ako je referentno stanje različito. Stoga vrijednosti NPQ i qP klijanaca tretiranih ionskim srebrom ne mogu uspoređivati s klijancima kontrole, a vrijednosti tretmana nanočesticama mogu uspoređivati i s kontrolom i s tretmanom ionima, uz dozu opreza.

Iako je tretman ionima srebra povećao  $QY_{max}$  klijanaca duhana, efektivni kvantni prinos ( $QY_{Lss}$ ) je smanjen u odnosu na kontrolu, što znači da ovi klijanci, iako imaju veći kapacitet PSII, slabije iskorištavaju apsorbiranu energiju. Pod utjecajem iona srebra smanjeno je i fotokemijsko i nefotokemijsko gašenje fluorescencije tijekom trajanja osvjetljenja ( $qP_{Lss}$  i  $NPQ_{Lss}$ ) pa osim što se energija slabije iskorištava, slabije se i osipa na kontroliran način putem NPQ. Nakon prestanka aktiničkog osvjetljenja, NPQ ( $NPQ_{D3}$ ) je u klijancima tretiranim ionima srebra veći nego u kontroli, dok u qP ( $qP_{D3}$ ) nema razlike. Ovakav rezultat upućuje na odgodu nefotokemijskog gašenja fluorescencije klorofila u klijancima tretiranim ionima srebra. Različite AgNP pokazale su različit utjecaj na fotosintezu klijanaca duhana. Iako tretman pozitivno nabijenim AgNP-bPEI najviše utječe na ultrastrukturu kloroplasta i smanjuje sadržaj klorofila *b* i karotenoida, utjecaj ovog tretmana na fotokemiju je najmanji. Po parametrima fotosinteze AgNP-bPEI ne odstupa značajno ni od kontrole, niti od tretmana ionima, osim u slučaju  $qP_{Lss}$  koji je sličan tretmanu srebrom i manji od kontrole, što znači da AgNP-bPEI ipak narušava fotokemiju. Tretmani negativno nabijenim AgNP-citrat i AgNP-PEG nisu pokazali razliku u odnosu na kontrolu u parametrima mjerenim nakon prestanka aktiničkog osvjetljenja, no svi parametri mjerenim tijekom aktiničkog osvjetljenja značajno su manji nego u kontroli. AgNP-citrat narušavaju  $QY_{Lss}$  i  $qP_{Lss}$  u istoj mjeri kao tretman ionima ili AgNP-bPEI, dok je utjecaj AgNP-PEG na ove parametre još izraženiji. Istovremeno AgNP-citrat ima najjači utjecaj na  $NPQ_{Lss}$ . Prema ovim rezultatima, AgNP-PEG najjače utječu na fotosintezu jer drastično smanjuju efektivni kvantni prinos i fotokemijsko gašenje fluorescencije, pa unatoč tome što tretirani klijanci imaju jednak kapacitet PSII kao kontrola, slabije provode fotokemiju. Budući tretmani oslabljuju fotokemijsko gašenje fluorescencije, za očekivati je da će nefotokemijsko gašenje porasti, no događa se suprotno. Sporo relaksirajuću komponentu NPQ nije moguće mjeriti kratkim protokolom kakav sam koristila i moguće je da se uočeni pad NPQ nadoknađuje kasnije. Ipak, moguće je da postoji još neki izljev energije koju prihvaća PSII, osim fotokemijskog i nefotokemijskog procesa te fluorescencije. Poznato je da same AgNP gase fluorescenciju ekstrahiranog klorofila (Falco i sur. 2015) te bi, ukoliko mogu dospjeti u blizinu

tilakoidnog sustava, AgNP mogle prihvatiti višak energije, što bi objasnilo dodatno gašenje fluorescencije uočeno u eksperimentu.

Jiang i sur. su 2017. istražili utjecaj AgNP na fotosintezu vodene leće (*Spirodela polyrhiza*). AgNP su uzrokovale smanjenje  $QY_{max}$ ,  $QY$  i NPQ tretiranih biljaka, pri čemu se NPQ ovisan o svjetlosti smanjio, a onaj neovisan o svjetlosti povećao te su zaključili da je pod utjecajem AgNP tolerancija na visok intenzitet svjetlosti smanjena. Ioni srebra uzrokovali su blago povećanje  $QY_{max}$ , premda ne statistički značajno, kao u mom eksperimentu. Moguće je da su kotiledoni klijanaca osjetljiviji na učinak iona srebra ili da sam eksperiment trebala provesti na većem broju replika. AgNP su u slučaju vodene leće uzrokovale smanjenje  $QY_{max}$  tek pri većim koncentracijama. Te koncentracije smanjile su i efektivni kvantni prinos ( $QY$ ), koji je i u mom eksperimentu smanjen u svim tretmanima, osim AgNP-bPEI. Ustanovili su da je učinak tretmana srebrom na gašenje fluorescencije klorofila vodene leće ovisan o intenzitetu aktiničke svjetlosti. Pri intenzitetu koji sam koristila na klijancima duhana rezultati Jiang i sur. pokazuju vrlo bliske vrijednosti  $qP$  i NPQ za različite tretmane, a razlike se uočavaju tek pri jačem intenzitetu. One idu u prilog mojim rezultatima, jer su AgNP uzrokovale smanjenje  $qP$  i NPQ kod vodene leće, kao i kod klijanaca duhana. Moguće je ipak da bi klijanci duhana pri većem intenzitetu aktiničke svjetlosti također pokazali drugačije vrijednosti te bi mjerenje fluorescencije klorofila bilo dobro ponoviti s drugačijim postavkama.

$QY_{max}$  je kod svih tretmana, ali i kontrole, manji od onog koji se očekuje za biljke u optimalnim uvjetima (oko 0,83). To može značiti da su klijanci uzgajani uz preintenzivno osvjetljenje te svi, uključujući i netretirane klijance, imaju PSII oštećen fotoinhibicijom (Maxwell i Johnson 2000). Ipak, očekivani  $QY_{max}$  se odnosi na tipične listove zdrave odrasle biljke i moguće je da se tilakoidni sustav klijanaca duhana tek 10 dana nakon početka isključivanja nije dovoljno razvio da dosegne optimalni  $QY_{max}$ .

Relativno slab učinak AgNP-bPEI na parametre fotosinteze klorofila odudara od ostalih rezultata vezanih uz toksičnost ove vrste nanočestica. To se posebno odnosi na ultrastrukturu kloroplasta i sadržaj fotosintetskih pigmenata, koji bi se mogli odraziti na parametre fotosinteze, a AgNP-bPEI na njih utječe više nego ostali tretmani. Moguće je da parametri fotosinteze klijanaca tretiranih AgNP-bPEI nisu dobro izmjereni, ali i da ultrastrukturne promjene kloroplasta primijećene kod ovih klijanaca i promjene u fotosintetskim pigmentima zapravo omogućavaju relativno dobru učinkovitost fotosinteze u uvjetima stresa.

## 6. Zaključak

- Nanočestice srebra stabilizirane pozitivnim (AgNP-bPEI), negativnim (AgNP-citrat) i slabo negativnim omotačima (AgNP-PEG) imaju ujednačen sferičan oblik i veličinu od oko 50 nm.
- Svi tretmani srebrom inhibiraju rast korijena klijanaca duhana, a pogotovo tretmani s AgNP. AgNP-PEG ima slabiji učinak na dužinu korijena od AgNP-bPEI i AgNP-citrat.
- Svi tretmani srebrom uzrokuju promjene u strukturi korijenovog vrška klijanaca duhana, a nanočestice pokazuju međusobno sličan učinak, jači od iona srebra.
- Tretmani nanočesticama i ionima srebra ne uzrokuju značajne promjene u strukturi kotiledona klijanaca duhana, kao ni u ultrastrukturi stanica meristema korijena.
- Svi tretmani srebrom uzrokuju ultrastrukturne promjene kloroplasta klijanaca duhana. Pritom su one najizraženije u tretmanu s AgNP-bPEI, a najmanje izražene u tretmanu s AgNP-PEG.
- Tretmani srebrom uzrokuju promjene u proteomu klijanaca duhana, uglavnom u vidu pojačane ekspresije proteina, koji su najčešće vezani uz fotosintezu i odgovor na stres. U slučaju nekoliko proteina postoji razlika u odgovoru na nanočestice i ione srebra. Među različitim AgNP, na proteom najmanje utječu AgNP-citrat.
- Tretman ionima srebra ne utječe na sadržaj fotosintetskih pigmenata klijanaca duhana. AgNP-bPEI smanjuju sadržaj klorofila *b* i karotenoida, a AgNP-citrat i AgNP-PEG povišuju sadržaj karotenoida.
- Ioni i nanočestice srebra imaju međusobno različit, ali negativan učinak na parametre fluorescencije klorofila u kotiledonima klijanaca duhana. Uglavnom uzrokuju smanjenje QY, NPQ i qP u uvjetima aktiničkog osvjetljenja. Pritom AgNP-bPEI imaju najslabiji učinak.
- Nanočestice srebra pri koncentraciji 100  $\mu$ M toksičnije su za klijance duhana od ionskog srebra iste koncentracije.
- Nanočestice srebra različitih omotača imaju različit učinak na različite aspekte toksičnosti koji su ovdje analizirani. Pritom su AgNP-bPEI nešto toksičnije od AgNP-citrat i AgNP-PEG.

## 7. Literatura

Ahamed M., AlSalhi M. S., Siddiqui M. K. J. (2010) Silver nanoparticle applications and human health. *Clinica Chimica Acta* 411: 1841-1848.

Alkhatib R., Maruthavanan J., Ghoshroy S., Steiner R., Sterling T., Creamer R. (2011) Physiological and ultrastructural effects of lead on tobacco. *Biologia plantarum* 56(4): 711-716.

Alscher R. G., Erturk N., Heath L. S. (2002) Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany* 372(53): 1331-1341.

Balen B., Pavoković D., Peharec Štefanić P., Krsnik-Rasol M. (2011) Elektroforetske tehnike istraživanja proteina. Hrvatska sveučilišna naklada, Zagreb.

Beer C., Foldbjerg R., Hayashi Y., Sutherland D. S., Autrup H. (2012) Toxicity of silver nanoparticles – Nanoparticle or silver ion? *Toxicology Letters* 208: 286-292.

Beyer, E. M. Jr. (1976) A potent inhibitor of ethylene action in plants. *Plant Physiology* 58: 268-271

Bjellquist B., Ek K., Righetti P. G., Gianazza E., Görg A., Westermeier R., Postel W. (1982) Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 6(4): 317-39.

Blakelock G. C., Xenopoulos M. A., Norman B. C., Vincent J. L., Frost P. C. (2016) Effects of silver nanoparticles on bacterioplankton in a boreal lake. *Freshwater Biology* 61: 2211-2220.

Bradford M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-54.

Caverzan A., Passaia G., Rosa S. B., Ribeiro C. W., Lazzarotto F., Margis-Pinheiro M. (2012) Plant responses to stresses: Role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection. *Genetics and Molecular Biology* 35: 1011-1019.

- Choi O., Deng K. K., Kim N.-J., Ross L. Jr., Surampalli R.Y., Hu Z. (2008) The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions, and silver chloride colloids on microbial growth. *Water Research* 42: 3066-3074.
- Chung I.-M., Park I., Seung-Hyun K., Thiruvengadam M., Rajakumar G. (2016) Plant-mediated synthesis of silver nanoparticles: their characteristic properties and therapeutic applications. *Nanoscale Research Letters* 11: 40.
- Cuypers A., Hendrix S., Dos Reis R. A., De Smet S., Deckers J., Gielen H., Jozefczak M., Loix C., Vercampt H., Vangronsveld J., Keunen E. (2016) Hydrogen peroxide, signaling in disguise during metal phytotoxicity. *Frontiers in Plant Science* 7: 470.
- Cvjetko P., Milošić A., Domijan A.-M., Vinković Vrček I., Tolić S. Peharec Štefanić P., Letofsky-Papst I., Tkalec M., Balen B. (2017) Toxicity of silver ions and differently coated silver nanoparticles in *Allium cepa* roots. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 137: 18-28.
- Da Costa M. V. J. i Sharma P. K. (2015) Effect of copper oxide nanoparticles on growth, morphology, photosynthesis, and antioxidant response in *Oryza sativa*. *Photosynthetica* 54: 110-119.
- Dietz K.-J., Jacob S., Oelze M.-L., Laxa M., Tognetti V., De Miranda S. M. N., Baier M., Finkemeier I. (2006) The function of peroxiredoxins in plant organelle redox metabolism. *Journal of Experimental Botany* 57: 1697-1709.
- Douce R., Bourguignon J., Neuburger M., Rébeillé F. (2011) The glycine decarboxylase system: a fascinating complex. *Trends in Plant Science* 6(4): 167-76.
- El-Nour K. M. M. A., Eftaiha A., Al-Warthan A., Ammar R. A. A. (2010) Synthesis and applications of silver nanoparticles. *Arabian Journal of Chemistry* 3: 135-140.
- Falco W. F., Queiroz A. M., Fernandes J., Botero E. R., Falcão E. A., Guimarães F. E. G., M'Peko J.-C., Oliveira S.L., Colbeck I., Caires A. R. L. (2015) Interaction between chlorophyll and silver nanoparticles: A close analysis of chlorophyll fluorescence quenching. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 299: 203-209.

Faurobert M., Pelpoir E., Chaïb J. (2007) Phenol extraction of proteins for proteomic studies of recalcitrant plant tissues. *Methods in Molecular Biology* 355: 9-14.

Geisler-Lee J., Wang Q., Yao Y., Zhang W., Geisler M., Li K., Huang Y., Chen Y., Kolmakov A., Ma X. (2013) Phytotoxicity, accumulation and transport of silver nanoparticles by *Arabidopsis thaliana*. *Nanotoxicology* 7(3): 323-337.

Geisler-Lee J., Brooks M., Gerfen J. R., Wang Q., Fotis C., Sparer A., Ma X., Berg R. H., Geisler M. (2014) Reproductive toxicity and life history study of silver nanoparticle effect, uptake and transport in *Arabidopsis thaliana*. *Nanomaterials* 4: 301-318.

Hecht S. S. (1999) Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 91(14): 1194-210.

Hossein, Z., Komatsu, S. (2013) Contribution of proteomic studies towards understanding plant heavy metal stress response. *Frontiers in Plant Science* 3: 310.

Hossain Z., Mustafa G., Komatsu S. (2015) Plant responses to nanoparticle stress. *International Journal of Molecular Sciences* 16: 26644-26653.

Jaspert N., Throm C., Oecking C. (2011) *Arabidopsis* 14-3-3 proteins: fascinating and less fascinating aspects. *Frontiers in Plant Science* 2: 96.

Jiang H.-S., Li M., Chang F.-Y., Li W., Yin L.-Y. (2012) Physiological analysis of silver nanoparticles and AgNO<sub>3</sub> toxicity to *Spirodela polyrhiza*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 31(8): 1880-1886.

Jiang H. S., Yin L. Y., Ren N. N., Zhao S. T., Li Z., Zhi Y., Shao H., Li W., Gontero B. (2017) Silver nanoparticles induced reactive oxygen species via photosynthetic energy transport imbalance in an aquatic plant. *Nanotoxicology* 11: 157-167.

Johnston H. J., Hutchison G., Christensen F. M., Peters S., Hankin S., Stone V. (2010) A review of the in vivo and in vitro toxicity of silver and gold particulates: Particle attributes and biological mechanisms responsible for the observed toxicity. *Critical Reviews in Toxicology* 40(4): 328-346.

Kalaji H. M., Jajoo A., Oukarroum A., Brestic M., Zivcak M., Samborska I. A., Cetner M. D., Łukasik I., Goltsev V., Ladle R. J. (2016) Chlorophyll *a* fluorescence as a tool to monitor

physiological status of plants under abiotic stress conditions. *Acta Physiologiae Plantarum* 38: 102.

Karas M. i Hillenkamp F. (1988) Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Analytical Chemistry* 60: 2299-2301.

Kosová K., Vítámvás P., Prášil I. T., Renaut J. (2011) Plant proteome changes under abiotic stress – Contribution of proteomics studies to understanding plant stress response. *Journal of Proteomics* 74: 1301-1322.

Laemmli U. K. (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

Lamkemeyer P., Laxa M., Collin V., Li W., Finkemeier I., Schöttler M. A., Holtkamp V., Tognetti V. B., Issakidis-Bourguet E., Kandlbinder A., Weis E., Miginiac-Maslow M., Dietz K. J. (2006) Peroxiredoxin Q of *Arabidopsis thaliana* is attached to the thylakoids and functions in context of photosynthesis. *The Plant Journal* 45: 968-981.

Lee M.-O., Kim K. P., Kim B., Hahn J.-S., Hong C. B. (2009) Flooding stress-induced Glycine-rich RNA-binding protein from *Nicotiana tabacum*. *Molecules and Cells* 27: 47-54.

Lee W.-M., Kwak J. I., An Y.-J. (2012) Effect of silver nanoparticles in crop plants *Phaseolus radiatus* and *Sorghum bicolor*: Media effect on phytotoxicity. *Chemosphere* 86: 491-499.

Lenz C. i Dihazi H. (2016) Introduction to proteomics technologies. *Methods in Molecular Biology* 1362: 3-27.

Lichtenthaler, H. K. (1987) Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology* 148: 350-382.

Lichtenthaler, H. K. i Buschmann, C. (2001) Chlorophylls and carotenoids: Measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* F4.3.1-F4.3.8.

Madhuri S., Ajoy K. C., Rohit K. (2010) Nanotechnology in agricultural diseases and food safety. *Journal of Phytology* 2: 83-92.



- Mashwani Z. U., Khan T, Khan M. A., Nadhman A. (2015) Synthesis in plants and plant extracts of silver nanoparticles with potent antimicrobial properties: current status and future prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology* 99(23): 9923-34.
- Matorin D. N., Todorenko D. A., Seifullina N. K., Zayadan B. K., Rubin A. B. (2013) Effect of silver nanoparticles on the parameters of chlorophyll fluorescence and P700 reaction in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Microbiology* 82(6): 809-814
- Maxwell K. i Johnson G. N. (2000) Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *Journal of Experimental Botany* 51(345): 659-668.
- Mirzajani F., Askari H., Hamzelou S., Schober Y., Römpp A., Ghassempour A., Spengler B. (2014) Proteomics study of silver nanoparticles toxicity on *Oryza sativa* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 108: 335-339.
- Mittler R. (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7(9): 405-10.
- Monica R. C. i Cremonini R. (2009) Nanoparticles and higher plants. *Caryologia* 62(2): 161-165.
- Müller P., Li X.-P., Niyogi K. K. (2001) Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiology* 125: 1558-1566.
- Murashige T. i Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15(3): 473-497.
- Murchie E. H. i Lawson T. (2013) Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications. *Journal of Experimental Botany* 64(13): 3983-98.
- Mustafa G., Sakata K., Hossain Z., Komatsu S. (2015) Proteomic study on the effects of silver nanoparticles on soybean under flooding stress. *Journal of Proteomics* 122: 100-118.
- Nair P. M. G. i Chung I. M. (2015) Physiological and molecular level studies on the toxicity of silver nanoparticles in germinating seedlings of mung bean (*Vigna radiata* L.). *Acta Physiologiae Plantarum* 37: 1719.

Pavoković D. i Balen B. (2007) Dvodimenzionalna elektroforeza u poliakrilamidnom gelu. U: Ristov A. A. (ur.) Metode u molekularnoj biologiji. Zagreb, Institut Ruđer Bošković, str. 575.

Peharec Štefanić P., Koffler T., Adler G., Bar-Zvi D. (2013) Chloroplasts of salt-grown *Arabidopsis* seedlings are impaired in structure, genome copy number and transcript levels. PLOS ONE 8: e82548.

Ramagli L. S. i Rodriguez L. V. (1985) Quantitation of microgram amounts of protein in two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis sample buffer. Electrophoresis 6: 559-563.

Ren N. i Timco M. P. (2001) AFLP analysis of genetic polymorphism and evolutionary relationships among cultivated and wild *Nicotiana* species. Genome 44: 559-571.

Reynolds E. S. (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. The Journal of Cell Biology 17: 208-12.

Roháček K. (2002) Chlorophyll fluorescence parameters: the definitions, photosynthetic meaning, and mutual relationships. Photosynthetica 40(1): 13-29.

Ruban A. V. (2016) Nonphotochemical chlorophyll fluorescence quenching: mechanism and effectiveness in protecting plants from photodamage. Plant Physiology 170: 1903-1916.

Schwab F., Zhai G., Kern M., Turner A., Schnoor J. L., Wiesner M. R. (2015) Barriers, pathways and processes for uptake, translocation and accumulation of nanomaterials in plants – Critical review. Nanotoxicology 10(3): 257-278.

Sekhon B. S. 2014 Nanotechnology in agri-food production: an overview. Nanotechnology, Science and Applications 7: 31-53.

Sierro N., Battey J. N. D., Ouadi S., Bakaher N., Bovet L., Willig A., Goepfert S., Peitsch M. C., Ivanov N. V. (2014) The tobacco genome sequence and its comparison with those of tomato and potato. Nature communications 5: 3833.

Sillen W. M. A., Thijs S., Abbamondi G. R., Janssen J., Weyens N., White J. C., Vangronsveld J. (2015) Effects of silver nanoparticles on soil microorganisms and maize biomass are linked in the rhizosphere. Soil Biology & Biochemistry 91: 14-22.

Silva T., Pokhrel L. R., Dubey B., Tolaymat T. M., Maier K. J., Li X. (2014) Particle size, surface charge and concentration dependent ecotoxicity of three organo-coated silver nanoparticles: Comparison between general linear model-predicted and observed toxicity. *Science of the Total Environment* 468: 968-976.

Sondi I. i Salopek-Sondi B. (2004) Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *Journal of Colloid and Interface Science* 275: 177-182.

Strader L. C., Beisner E. R., Bartel B. (2009) Silver ions increase auxin efflux independently of effects on ethylene response. *The Plant Cell* 21: 3585-3590.

Syu Y., Hung J.-H., Chen J.-C., Chuang H. (2014) Impacts of size and shape of silver nanoparticles on *Arabidopsis* plant growth and gene expression. *Plant Physiology and Biochemistry* 83: 57-64.

Tejamaya M., Römer I., Merrifield R. C., Lead J. R. (2012) Stability of citrate, PVP, and PEG coated silver nanoparticles in ecotoxicology media. *Environmental Science & Technology* 46(13): 7011-7017.

Thuesombat P., Hannongbua S., Ekgasit S., Chadchawan S. (2016) Effects of silver nanoparticles on hydrogen peroxide generation and antioxidant enzyme responses in rice. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 16: 8030-8043.

Tripathi B. N., Bhatt I., Dietz K. J. (2009) Peroxiredoxins: a less studied component of hydrogen peroxide detoxification in photosynthetic organisms. *Protoplasma* 235: 3-15.

Tripathi D. K., Singh V. P., Prasad S. M., Chauhan D. K., Dubey N. K., Rai A. K. (2015) Silicon-mediated alleviation of Cr(VI) toxicity in wheat seedlings as evidenced by chlorophyll fluorescence, laser induced breakdown spectroscopy and anatomical changes. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 113: 133-144.

Tripathi D. K., Gaur S., Singh S., Singh S., Pandey R., Singh V. P., Sharma N. C., Prasad S. M., Dubey N. K., Chauhan D. K. (2016) An overview on manufactured nanoparticles in plants: Uptake, translocation, accumulation and phytotoxicity. *Plant Physiology and Biochemistry* 110: 2-12.

Tripathi D. K., Tripathi A., Shweta, Singh S., Singh Y., Vishwakarma K., Yadav G., Sharma S., Singh V. K., Mishra R. K., Upadhyay R. G., Dubey N. K., Lee Y., Chauhan D. K. (2017) Uptake, accumulation and toxicity of silver nanoparticle in autotrophic plants, and heterotrophic microbes: a concentric review. *Frontiers in Microbiology* 8: 07.

Vannini C., Domingo G., Onelli E., Princi B., Marsoni M., Espen L., Bracale M. (2013) Morphological and proteomic responses of *Eruca sativa* exposed to silver nanoparticles or silver nitrate. *PLoS ONE* 8: e68752.

Voss I., Sunil B., Scheibe R., Raghavendra A. S. (2012) Emerging concept for the role of photorespiration as an important part of abiotic stress response. *Plant Biology* (Stuttgart, Germany) 15(4): 713-22.

Wen R., Torres-Acosta J. A., Pastushok L., Lai X., Pelzer L., Wang H., Xiao W. (2008) Arabidopsis UEV1D promotes lysine-63-linked polyubiquitination and is involved in DNA damage response. *The Plant Cell* 20: 213-227.

Wijnhoven S. W. P., Peijnenburg W. J. G. M., Herberts C. A., Hagens W. I., Oomen A. G., Heugens E. H. W., Roszek B., Bisschops J., Gosens I., Van De Meent D., Dekkers S., De Jong W. H., Van Zijverden M., Sips A. J. A. M., Geertsma R. E. (2009) Nano-silver – a review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment. *Nanotoxicology* 3(2): 103-138.

Yin L., Cheng Y., Espinasse B., Colman B. P., Auffan M., Wiesner M., Rose J., Liu J., Bernhardt E. S. (2011) More than the ions: the effects of silver nanoparticles on *Lolium multiflorum*. *Environmental Science & Technology* 45: 2360-2367.

Yoo i sur. 2011 Single cystathionine  $\beta$ -synthase domain-containing proteins modulate development by regulating the thioredoxin system in Arabidopsis. *The Plant Cell* 23: 3577-3594.

Yuan H.-M., Xu H.-H., Liu W.-C., Lu Y.-T. (2013) Copper regulates primary root elongation through PIN1-mediated auxin redistribution. *Plant Cell Physiology* 54(5): 766-778.

Zhai Y., Hunting E. R., Wouters M., Peijnenburg W. J. G. M., Vijver M. G. (2016) Silver nanoparticles, ions, and shape governing soil microbial functional diversity: nano shapes micro. *Frontiers in Microbiology* 7: 1123.

<<http://www.eol.org/pages/581050/overview>> (1. 4. 2017)

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>> (5. 4. 2017)

<<http://product.statnano.com>> (1. 4. 2017)

<<http://www.psi.cz/products/pocket-sized-instruments/fluorpen-fp-100>> (1. 4. 2017)

<<http://www.uniprot.org>> (5. 4. 2017)

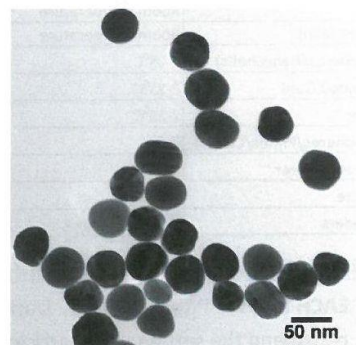
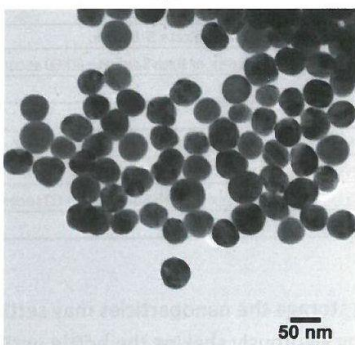
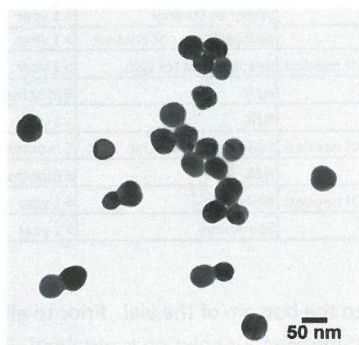
## Prilog 1



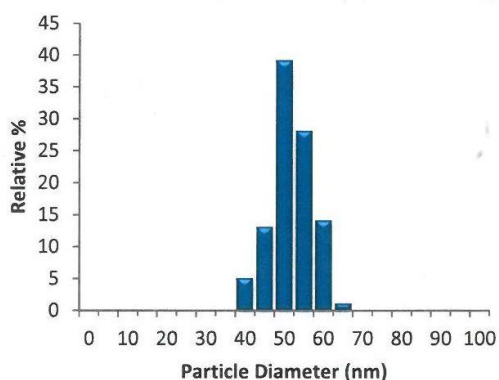
### 50 nm bPEI NanoXact™ Silver

Lot Number: JCP1432

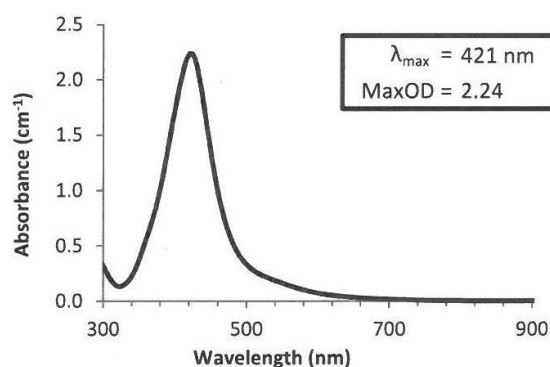
Diameter (TEM):	49.6 ± 5.2 nm	Hydrodynamic Diameter:	70.6 nm
Coefficient of Variation:	10.4 %	Zeta Potential:	81.9 mV
Surface Area (TEM):	11.3 m <sup>2</sup> /g	pH of Solution:	6.1
Mass Concentration (Ag):	0.021 mg/mL	Silver Purity:	99.99 %
Particle Concentration:	3.1E+10 particles/mL	Particle Surface:	bPEI
		Solvent:	Milli-Q Water



#### Size Distribution



#### Optical Properties



#### Characterization Instrumentation

Diameter and Size Statistics:	JEOL 1010 Transmission Electron Microscope
Mass Concentration:	Thermo Fisher X Series 2 ICP-MS
Spectral Properties:	Agilent 8453 UV-Visible Spectrometer
Hydrodynamic Diameter/Zeta Potential:	Malvern Zetasizer Nano ZS.

Storage: 4-8 °C away from light. DO NOT FREEZE.

nanoComposix, Inc  
4878 Ronson Ct. Suite K  
San Diego, CA 92111

[nanoComposix.com](http://nanoComposix.com)

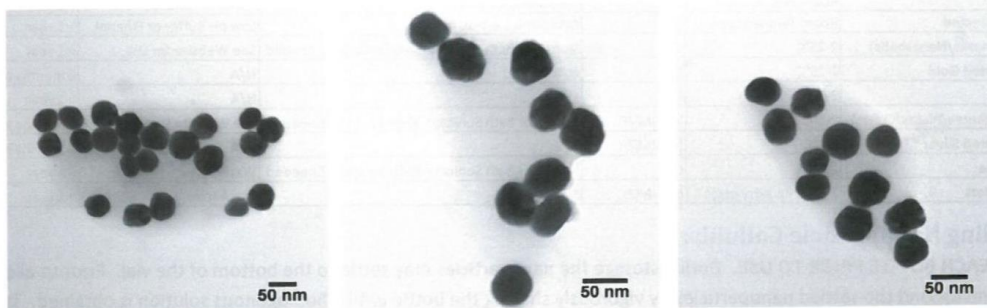
[info@nanocomposix.com](mailto:info@nanocomposix.com)  
Phone: (858) 565-4227  
Fax: (619) 330-2556

Slika P1: Specifikacije komercijalno dostupnih nanočestica srebra stabiliziranih pomoću pozitivno nabijenog razgranatog polietilenimin kationa (AgNP-bPEI) korištenih u ovom radu.

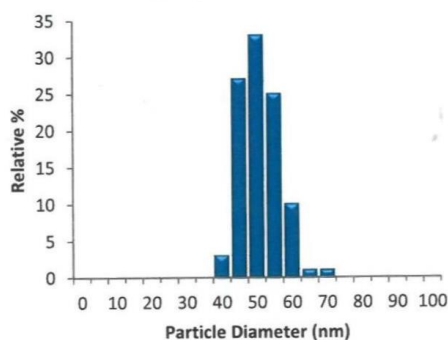
## 50 nm Citrate NanoXact™ Silver

Lot Number: SXM0024

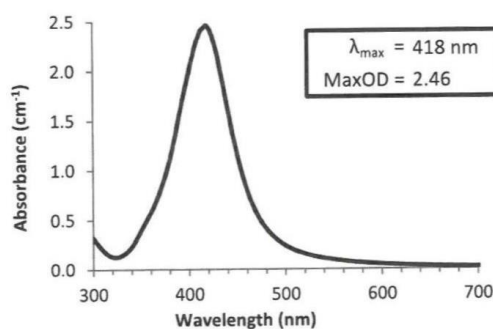
Diameter (TEM):	48.6 ± 5.3 nm	Hydrodynamic Diameter:	54.0 nm
Coefficient of Variation:	10.9 %	Zeta Potential:	-47.8 mV
Surface Area (TEM):	11.5 m <sup>2</sup> /g	pH of Solution:	7.0
Mass Concentration (Ag):	0.021 mg/mL	Silver Purity:	99.99 %
Particle Concentration:	3.4E+10 particles/mL	Particle Surface:	Sodium Citrate
		Solvent:	Aqueous 2mM Citrate



Size Distribution



Optical Properties



### Characterization Instrumentation

Diameter and Size Statistics:	JEOL 1010 Transmission Electron Microscope
Mass Concentration:	Thermo Fisher X Series 2 ICP-MS
Spectral Properties:	Agilent 8453 UV-Visible Spectrometer
Hydrodynamic Diameter/Zeta Potential:	Malvern Zetasizer Nano ZS.

Storage: 4-8 °C away from light. DO NOT FREEZE.

nanoComposix, Inc  
4878 Ronson Ct. Suite K  
San Diego, CA 92111

[nanoComposix.com](http://nanoComposix.com)

[info@nanocomposix.com](mailto:info@nanocomposix.com)  
Phone: (858) 565-4227  
Fax: (619) 330-2556

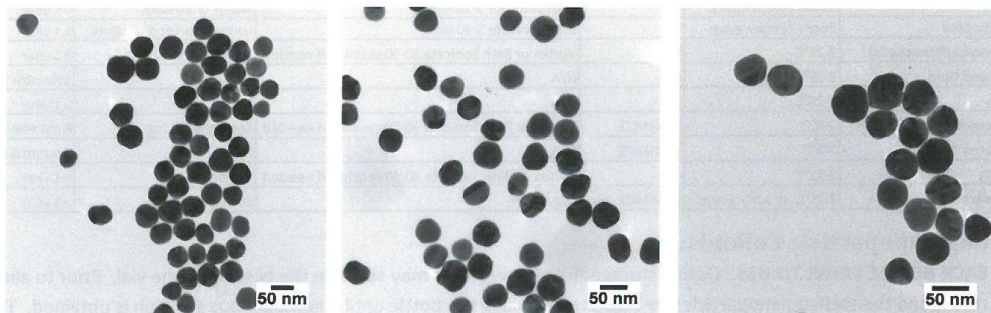
Slika P2: Specifikacije komercijalno dostupnih nanočestica srebra stabiliziranih pomoću negativnog nabijenog citratnog aniona (AgNP-citrat) korištenih u ovom radu.



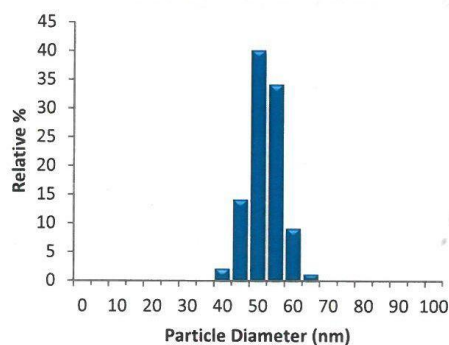
## 50 nm PEG NanoXact™ Silver

Lot Number: CLF0674

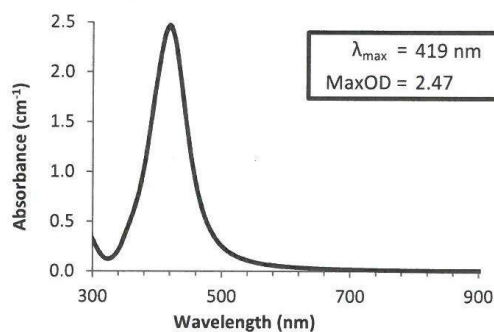
Diameter (TEM):	49.3 ± 4.4 nm	Hydrodynamic Diameter:	81.2 nm
Coefficient of Variation:	9.0 %	Zeta Potential:	-25.1 mV
Surface Area (TEM):	11.4 m <sup>2</sup> /g	pH of Solution:	6.1
Mass Concentration (Ag):	0.021 mg/mL	Silver Purity:	99.99 %
Particle Concentration:	3.3E+10 particles/mL	Particle Surface:	mPEG 5 kDa
		Solvent:	Milli-Q Water



Size Distribution



Optical Properties



### Characterization Instrumentation

Diameter and Size Statistics:	JEOL 1010 Transmission Electron Microscope
Mass Concentration:	Thermo Fisher X Series 2 ICP-MS
Spectral Properties:	Agilent 8453 UV-Visible Spectrometer
Hydrodynamic Diameter/Zeta Potential:	Malvern Zetasizer Nano ZS.

Storage: 4-8 °C away from light. DO NOT FREEZE.

Slika P3: Specifikacije komercijalno dostupnih nanočestica srebra stabiliziranih pomoću neutralnog polietilen-glikola (AgNP-PEG) korištenih u ovom radu.



## Prilog 2

Primjer rezultata pretrage programom MASCOT. Peptidi identificirani spektrometrijom masa uspoređeni su s bazom podataka NCBIInr te je prema homologiji identificiran protein od kojeg potječu. Dotični primjer odnosi se na mrlju 1. Analogno tome identificirani su i ostali proteini.

# MASCOT Search Results

## Protein View: gi|270311593

photosystem I reaction center subunit [Nicotiana tabacum]

**Database:** NCBIInr  
**Score:** 197  
**Expect:** 3.5e-014  
**Nominal mass (M<sub>r</sub>):** 18028  
**Calculated pI:** 9.19  
**Taxonomy:** [Nicotiana tabacum](#)

Sequence similarity is available as [an NCBI BLAST search of gi|270311593 against nr](#).

## Search parameters

**Enzyme:** Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P.  
**Variable modifications:** [Carbamidomethyl \(C\)](#), [Oxidation \(M\)](#)

## Protein sequence coverage: 48%

Matched peptides shown in **bold red**.

```
1  MAAMNSSVLA CSYAVSGIGA SELTSKHASI ASQSVQKWPV IKAQQSKVLD
51 SEANKNQAGR RIALLGAAAA LFTAASSNSS ANAGVIDDYL ESKSKANKELN
101 DKKRLATSGA NFARAYTVQF GTCKFPENFT GCQDLAKQKK VPFISDDLAL
151 ECEGKDKYKC GSNVFWKW
```

Unformatted sequence string: [168 residues](#) (for pasting into other applications).

Sort peptides by

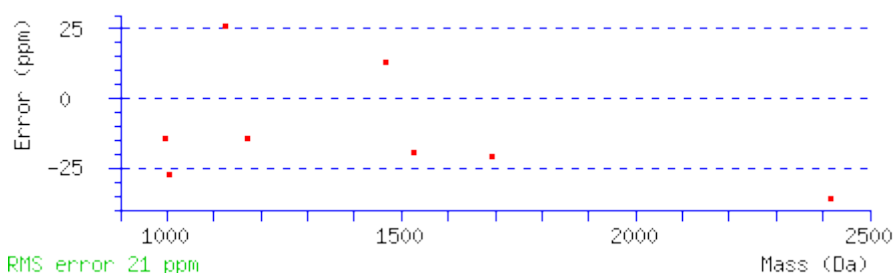
Residue Number

Increasing Mass

Decreasing Mass

Show predicted peptides also

Que ry	Sta rt	En d	Observ ed	Mr (exp t)	Mr (cal c)	ppm <sub>M</sub>	Sco re	Peptide
<a href="#">70</a>	2	-26	2417.0 811	2416.0 738	2416.1 614	- 36.0 2		M.AAMNSSVLACSYAVSGIGA SELSK.H
<a href="#">35</a>	105	-11 4	1007.4 992	1006.4 919	1006.5 196	- 27.0 5		R.LATSGANFAR.A
<a href="#">46</a>	115	-12 4	1174.5 389	1173.5 316	1173.5 489	- 14.0 7		R.AYTVQFGTCK.F + Carbamidomethyl (C)
<a href="#">47</a>	115	-12 4	1174.5 389	1173.5 317	1173.5 489	- 14.033 7		R.AYTVQFGTCK.F + Carbamidomethyl (C)
<a href="#">48</a>	125	-13 7	1469.6 921	1468.6 848	1468.6 657	- 13.0 0		K.FPENFTGCQDLAK.Q
<a href="#">51</a>	125	-13 7	1526.6 644	1525.6 571	1525.6 871	- 19.0 7		K.FPENFTGCQDLAK.Q + Carbamidomethyl (C)
<a href="#">52</a>	125	-13 7	1526.6 644	1525.6 572	1525.6 871	- 19.086 7		K.FPENFTGCQDLAK.Q + Carbamidomethyl (C)
<a href="#">53</a>	141	-15 5	1692.7 792	1691.7 719	1691.8 076	- 21.037 1		K.VPFISDDLAECEGK.D + Carbamidomethyl (C)
<a href="#">54</a>	141	-15 5	1692.7 792	1691.7 719	1691.8 076	- 21.0 1		K.VPFISDDLAECEGK.D + Carbamidomethyl (C)
<a href="#">32</a>	160	-16 7	997.44 19	996.43 46	996.44 87	- 14.0 2		K.CGSNVFWK.W + Carbamidomethyl (C)
<a href="#">43</a>	160	-16 8	1126.5 432	1125.5 359	1125.5 066	- 26.1 1		K.CGSNVFWKW.-



LOCUS ACZ72945 168 aa linear PLN 13-DEC-2009  
 DEFINITION photosystem I reaction center subunit [Nicotiana tabacum].  
 ACCESSION ACZ72945  
 VERSION ACZ72945.1  
 DBSOURCE accession GU187328.1  
 KEYWORDS .  
 SOURCE Nicotiana tabacum (common tobacco)  
 ORGANISM Nicotiana tabacum  
 Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta;  
 Tracheophyta;  
 Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; Gunneridae;  
 Pentapetales; asterids; lamiids; Solanales; Solanaceae;  
 Nicotianoideae; Nicotianeae; Nicotiana.  
 REFERENCE 1 (residues 1 to 168)  
 AUTHORS Zhou, J., Wang, Y.Y. and Yang, A.G.  
 TITLE Cloning and expression of PSAN  
 JOURNAL Unpublished  
 REFERENCE 2 (residues 1 to 168)  
 AUTHORS Zhou, J., Wang, Y.Y., Yang, A.G. and Liu, G.S.  
 TITLE Direct Submission  
 JOURNAL Submitted (08-NOV-2009) Genetics and Breeding Center, Tobacco  
 Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences,  
 11 Keyuanjingsi Rd., Qingdao, Shandong 266101, China  
 COMMENT Method: conceptual translation supplied by author.  
 FEATURES Location/Qualifiers  
 source 1..168  
 /organism="Nicotiana tabacum"  
 /db\_xref="taxon:4097"  
 Protein 1..168  
 /product="photosystem I reaction center subunit"  
 Region 34..168  
 /region\_name="PLN00054"  
 /note="photosystem I reaction center subunit N;  
 Provisional"  
 /db\_xref="CDD:215042"  
 CDS 1..168  
 /gene="PsaN"  
 /coded\_by="GU187328.1:116..622"

## **Životopis**

### Osnovne informacije

Ime i prezime	Elizabeta Banić	Datum rođenja	7. prosinca 1992.
Adresa	Donja Poljana 1 10310 Ivanić Grad	Mjesto rođenja	Zagreb

### Obrazovanje

1999. – 2007.	OŠ Đure Deželića, Ivanić Grad
2007. – 2011.	V. gimnazija, Zagreb
2011. – 2014.	Preddiplomski sveučilišni studij molekularne biologije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu Završni rad: Regulacija spiralne filotaksije u cvjetnica Mentorica: izv. prof. dr. sc. Dunja Leljak-Levanić
2014. – 2017.	Diplomski sveučilišni studij molekularne biologije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu
Srpanj 2015.	Dvotjedna ljetna škola “Exploring Nature's Molecular Machines”, Sveučilište u Utrechtu, Nizozemska

### Laboratorijska stručna praksa

Ožujak – lipanj 2014.	Stručna praksa iz kulture biljnog tkiva Zavod za molekularnu biologiju, PMF, Zagreb Mentorica: izv. prof. dr. sc. Dunja Leljak-Levanić
Siječanj 2015. – srpanj 2016.	Stručna praksa iz biljne proteomike i izrada diplomskog rada Zavod za molekularnu biologiju, PMF, Zagreb Mentorica: doc. dr. sc. Petra Peharec Štefanić
Listopad 2016. – siječanj 2017.	Stručna praksa iz komparativne genetike i razvojne biologije biljaka Institut Max Planck za istraživanje uzgoja biljaka, Köln, Njemačka Mentor: dr. sc. Francesco Vuolo

### Ostala postignuća

Rujan 2012. – veljača 2013.	Demonstratorica na praktikumu Zoologije
Listopad 2015.	Demonstratorica na praktikumu Razvojne biologije
Lipanj 2016.	Demonstratorica na praktikumu Uvoda u proteomiku
2015. – 2016.	Članica Organizacijskog odbora prvog i drugog Simpozija studenata bioloških usmjerenja - SiSB

2012. – 2017. Članica Udruge studenata biologije - BIUS
- Ožujak 2015. – Suvoditeljica Sekcije za skakavce i zrikavce u sklopu Udruge studenata  
rujan 2016. biologije - BIUS
2014. – 2016. Sudjelovanje u istraživačko-edukacijskim projektima „Grabovača 2014.“,  
„Papuk 2015.“ i „Mura-Drava 2016.“ u organizaciji Udruge studenata  
biologije - BIUS
2015. Jedna od dobitnika Posebne rektorove nagrade za istraživačko-edukacijski  
projekt „Grabovača 2014.“ Udruge studenata biologije - BIUS
2012. – 2016. Sudjelovanje na Noći biologije
2012. Jedna od dobitnika Posebne rektorove nagrade za znanstveno-  
popularizacijski projekt „Noć biologije“

#### Sažeci sa znanstvenih skupova

1. Majsec, K., **Banić, E.**, Cindrić, M., Balen, B., Peharec Štefanić, P. (2016) Proteomic responses of *Nicotiana tabacum* seedlings exposed to differently coated silver nanoparticles// *2nd INPPO World Congress in Bratislava, Book of Abstracts* / Hajduch, Martin ; Klubicova, Katarina; Skultety, Ludovit (ur.). Bratislava, Slovakia : Institute of Plant Genetics and Biotechnology, Slovak Academy of Sciences Biomedical Research Center, Slovak Academy of Sciences, pp 68-68 (postersko priopćenje, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
2. Peharec Štefanić, P., **Banić, E.**, Cindrić, M. (2016) Identification of proteins from tobacco seedlings (*Nicotiana tabacum*) exposed to silver nanoparticles from 2-D gel electrophoresis using AssayMAP technology // *2nd INPPO World Congress in Bratislava, Book of Abstracts* / Hajduch, Martin ; Klubicova, Katarina ; Skultety, Ludovit (ur.). Bratislava, Slovakia : Institute of Plant Genetics and Biotechnology, Slovak Academy of Sciences Biomedical Research Center, Slovak Academy of Sciences, pp 81-81 (postersko priopćenje, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
3. Peharec Štefanić, P., **Banić, E.**, Balen, B., Cindrić, M. (2016) Proteomic responses of *Nicotiana tabacum* seedlings exposed to differently coated silver nanoparticles// *EMBO workshop, 10th European Summer School "Advanced proteomics"* / Kuster, Bernhard ; Lemeer, Simone ; Marcus, Katrin ; Urlaub, Henning ; May, Caroline Brixen/Bressanone, pp 68-68 (postersko priopćenje, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).